



Titre: Mise au point et validation d'un procédé de production de champignons endomycorhiziens en bioréacteur
Title:

Auteur: Martin Gaudette
Author:

Date: 1997

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Gaudette, M. (1997). Mise au point et validation d'un procédé de production de champignons endomycorhiziens en bioréacteur [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/6863/>
Citation:

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/6863/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche:
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MISE AU POINT ET VALIDATION D'UN PROCÉDÉ
DE PRODUCTION DE CHAMPIGNONS
ENDOMYCORHIZIENS EN BIORÉACTEUR

MARTIN GAUDETTE
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

JUIN 1997



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-33136-9

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

MISE AU POINT ET VALIDATION D'UN PROCÉDÉ
DE PRODUCTION DE CHAMPIGNONS
ENDOMYCORHIZIENS EN BIORÉACTEUR

présenté par : GAUDETTE Martin

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. LEGROS Robert, Ph.D., président

M. CHAVARIE Claude, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. ARCHAMBAULT Jean, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. FORTIN J. ANDRÉ, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier la compagnie Premier Tech Inc. de leur support financier à la recherche au développement des endomycorhizes.

J'aimerais également remercier mon directeur Claude Chavarie et mon codirecteur Jean Archambault qui m'ont permis de travailler sur ce projet.

J'aimerais remercier tout le groupe de recherche de cellules de plantes pour leur disponibilité, leurs encouragements et leur aide technique et théorique.

J'aimerais remercier Mario Jolicoeur qui m'a donné le goût de la recherche, qui m'a appris les bases de la biotechnologie, les rigueurs nécessaires pour arriver à ces fins, mais qui a surtout transformé cette étude en expérience de vie.

Finalement j'aimerais remercier Élise Desrosiers ma femme qui m'a accompagné dans cette expérience et qui a fait preuve de beaucoup de patience.

À tous merci!

RÉSUMÉ

Les champignons endomycorhiziens ouvrent la porte à une nouvelle forme d'engrais biologiques. Cependant les productions actuelles sont réalisées dans des serres et demandent une main-d'oeuvre, des espaces et des temps de culture très importants, ce qui a pour conséquence d'augmenter le coût du produit. Il est donc primordial de développer des systèmes de production économique à grande échelle, de champignons endomycorhiziens.

Dans cet optique, l'objectif de ce projet était d'étudier le bioréacteur gel-papier conçu par le centre de recherche BIOPRO afin d'en maximiser la production pour ultimement développer un système de production industriel de champignons endomycorhiziens à arbuscules et vésicules.

La production moyenne atteinte avec ce bioréacteur est de $9,9 \cdot 10^5$ propagules (vésicules et spores) par litre utile en 112 jours de culture. Cette production ramenée sur une base journalière dépasse de loin les productions déjà obtenues par BIOPRO ($2200 \text{ propagules} \cdot \text{g}^{-1}$ de racine_{humide} inoculée $\cdot \text{j}^{-1}$ pour 112 jours de culture versus $90 \text{ propagules} \cdot \text{g}^{-1}$ de racine_{humide} inoculée $\cdot \text{j}^{-1}$ pour 68 jours de culture).

Le suivi dans le temps de la consommation des nutriments a permis de confirmer qu'une concentration extraracinaire faible en PO_4 permettait d'accroître la production d'endomycorhizes. En effet lorsque la concentration en PO_4 est inférieure à 0,04 mM, le nombre par litre utile passe de 20 000 spores produites en 56 jours à 185 000 avec 28 jours de plus de culture, et les vésicules passent de 130 000 unités produites en 56 jours à 800 000 pour 56 jours de plus de culture. Ce suivi des nutriments a également permis d'observer que le NO_3 est un élément essentiel au développement du symbiote.

Malgré des performances de production très intéressantes, le bioréacteur gel-papier n'est pas un procédé qui peut être transposé à grande échelle. Un bioréacteur tubulaire simulant l'effet de compartimentalisation du système gel-papier a donc été conçu. Ce bioréacteur, opéré en semi-continu, permet une production de spores de $4 \cdot 10^5 \text{ spores} \cdot L_{\text{utile}}^{-1}$ en 112 jours de culture (ou $3570 \text{ spores} \cdot L_{\text{utile}}^{-1} \cdot j^{-1}$). Cette production est deux fois supérieure à la production de spores du bioréacteur gel-papier et représente 40% de sa production totale. Ce même bioréacteur, opéré en cuvée, permet une production qui s'approche des bioréacteurs gel-papier (gel-papier: $8800 \text{ propagules} \cdot L_{\text{utile}}^{-1} \cdot j^{-1}$ pour des cultures de 112 jours; tubulaire en cuvée: $6200 \text{ propagules} \cdot L_{\text{utile}}^{-1} \cdot j^{-1}$ pour des cultures de 140 jours).

Des essais avec un nouveau type de support de culture pour les endomycorhizes, de la Perlite^{MC}, ont été réalisés. La Perlite^{MC}, utilisée couramment en horticulture pour l'amendement des sols, a permis d'obtenir une production de spores égale au bioréacteur gel-papier ($1,9 \cdot 10^5$ spores $\cdot L_{utile}^{-1}$ en 112 jours). Cependant la colonisation racinaire est 40% plus faible que celle des bioréacteurs gel-papier. Le largage de sodium (2,0 mM) semble être la principale cause de cette faible colonisation. Ce problème semble pouvoir être résolu en saturant la Perlite^{MC} en potassium avant les cultures.

Finalement la concentration de CO₂ dans la phase gazeuse des bioréacteurs semble être liée à la production de propagules endomycorhiziennes. En effet le plafonnement du taux de production de CO₂ (CPR) dans les cultures en bioréacteurs indique le début de la phase exponentielle de production.

ABSTRACT

Endomycorrhizal fungi are a new form of biological fertilizer. Currently, production of endomycorrhizae is done in greenhouses, which requires high levels of manpower and space. These requirements and long culture times, result in high production costs. Therefore, it is essential to develop a new system for industrial production of endomycorrhizal fungus.

The objective of this project was to increase our knowledge of the gel-paper bioreactor developed by BIOPRO, in order to maximize production which will lead to the development of an industrial scale system.

In this study, the average production reached $9.9 \cdot 10^5$ propagules (vesicles and spores) per liter in 112 days with this bioreactor or $2200 \text{ propagules} \cdot \text{g}^{-1} \text{ wet inoculated root} \cdot \text{d}^{-1}$ for 112 days of culture. This production is the highest ever obtained under bioreactor conditions. The highest production previously obtained by BIOPRO was $90 \text{ propagules} \cdot \text{g}^{-1} \text{ wet inoculated root} \cdot \text{j}^{-1}$ for 68 days of culture.

The monitoring of nutrient concentrations in the cultures have shown that a level of less than 0.04 mM PO_4 leads to an increased production of endomycorrhizae.

The production of spores increased from 20 000 in 56 days to 185 000 with 28 more days of culture. The production of vesicles increased from 130 000 in 56 days to 800 000 with 56 more days of culture.

The gel-paper bioreactor showed good productivity but the scale up potential of this system is limited. Therefore, a tubular bioreactor was developed simulating the gel-paper process. When this system was used in semi-batch culture, the production reached $4 \cdot 10^5$ spores $\cdot L^{-1}$ for 112 days of culture (or 3570 spores $\cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$). This spore production was twice that obtained with the gel-paper bioreactor and 40% of its total production. When this bioreactor was used in batch, total production was 70% to the total production with the gel-paper bioreactor (gel-paper: 8800 propagules $\cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ for 112 days of culture; batch tubular: 6200 propagules $\cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ for 140 days of culture).

An alternative support for culture, Perlite™ was also tested. Perlite™ is currently used in horticulture to improve soil quality. Production obtained with a bioreactor using Perlite™ was $1.9 \cdot 10^5$ spores $\cdot L^{-1}$ in 112 days. However, colonization of roots was 40% less than that reached with the gel-paper bioreactor. The release of sodium (2.0 mM) into the medium from Perlite™ seemed to be the cause of this decrease in colonization. This problem can be solved with saturation of Perlite™ by a KNO_3 solution.

Finally, the concentration of CO₂ in the headspace of the bioreactor was related to the production of endomycorrhizae. Leveling of the CO₂ production rate (CPR) in the bioreactor culture coincided with the beginning of the exponential phase of propagule production.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES	XVIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XX
1.0 INTRODUCTION	1
2.0 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
2.1 CARACTÉRISTIQUES DES MYCORHIZES	5
2.2 CARACTÉRISTIQUES DU SYMBIOTE ENDOMYCORHIZE-PLANTE	6
2.2.1 DESCRIPTION BIOLOGIQUE DE LA SYMBIOSE ENDOMYCORHIZIENNE AVEC LES PLANTES	6
2.2.1.1 Les spores	7
2.2.1.2 Les hyphes.....	8
2.2.1.3 Les arbuscules	9

2.2.1.4 Les vésicules.....	10
2.2.1.5 Schématisation de la colonisation d'une racine par les M.A.....	12
2.2.2 EFFET BÉNÉFIQUE DE LA SYMBIOSE ENTRE LES PLANTES ET LES M.A.....	14
2.2.3 FACTEURS INFLUENÇANTS LA COLONISATION RACINAIRE.....	15
2.3 ASPECTS NUTRITIONNELS	20
2.3.1 LES NUTRIMENTS IMPLIQUÉS DANS LA COLONISATION RACINAIRE.....	20
2.3.1.1 Le phosphore.....	20
2.3.1.2 L'azote.....	22
2.3.1.3 Le carbone.....	24
2.3.1.4 Le sulfate de sodium.....	25
2.3.2 MILIEUX DE CULTURES.....	26
2.4 TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO DES CHAMPIGNONS	
ENDOMYCORHIZIENS	31
2.4.1 LES RACINES HÔTES TRANSFORMÉES	32
2.4.2 TYPES DE CULTURE DE RACINES CHEVELUES TRANSFORMÉES.....	34
2.4.3 MODES DE CULTURE DES SYMBIOTES.....	36
3.0 OBJECTIFS DE CE PROJET DE RECHERCHE.....	44

4.0 MATÉRIELS ET MÉTHODES	47
4.1 SYMBIOTES UTILISÉS POUR LES CULTURES	47
4.2 CULTURES EN BIORÉACTEURS	47
4.2.1 PRÉPARATION DES INOCULA	47
4.2.2 MILIEU DE CULTURE	48
4.2.3 DESCRIPTION PHYSIQUE DES BIORÉACTEURS	50
4.2.3.1 Bioréacteur tubulaire	51
4.2.3.2 Bioréacteur gel-papier avec encavures	53
4.2.3.3 Bioréacteur avec Perlite ^{MC}	54
4.3 ÉCHANTILLONAGE	56
4.4 MÉTHODES ANALYTIQUES	56
4.4.1 MESURE ET ÉVALUATION DU CO ₂ PRODUIT	56
4.4.1.1 Mesure du CO ₂	56
4.4.1.2 Évaluation de la production de CO ₂ par la biomasse	58
4.4.2 MESURE DE LA BIOMASSE, DU pH, DE LA CONDUCTIVITÉ, DES IONS ET DES HYDRATES DE CARBONE	62
4.4.2.1 Hydrates de carbone	62
4.4.2.2. Chromatographie ionique	63
4.5 MESURE DE LA PRODUCTION DE PROPAGULES	64
4.5.1 MESURE DE LA QUANTITÉ DE VÉSICULES INTRA-RACINAIRES	64
4.5.2 MESURE DE LA QUANTITÉ ET DE LA VIABILITÉ DES SPORES	65

4.5.3 MESURE DE LA MASSE D'UNE SPORE	69
5.0 RÉSULTATS ET DISCUSSION	70
5.1 ÉTUDE DU BIORÉACTEUR GEL-PAPIER	70
5.1.1 BIORÉACTEUR AVEC ENCAVURES	70
5.1.2 PLAN EXPÉRIMENTAL	71
5.1.3 PRODUCTION DE PROPAGULES	73
5.1.4 CONSOMMATION DES NUTRIMENTS ET LEUR INFLUENCE SUR LA CULTURE.....	77
5.1.5 SUIVI DU CPR ET DU Q_{CO2X}	79
5.1.6 SUIVI DES AUTRES PARAMÈTRES MESURÉS.....	82
5.1.7 COMPARAISON DES BIORÉACTEURS GEL-PAPIER ET GEL.....	84
5.1.8 DISTRIBUTION DES PROPAGULES.....	90
5.2 ÉLABORATION DE SOLUTIONS DE REMPLACEMENT	
AU BIORÉACTEUR GEL-PAPIER.....	95
5.2.1 BIORÉACTEUR TUBULAIRE.....	95
5.2.2 BIORÉACTEUR AVEC MILIEU LIQUIDE.....	101
5.2.3 BIORÉACTEUR AVEC PERLITE ^{MC}	104
5.2.3.1 Plan expérimental.....	105
5.2.3.2 Évaluation de la production	106
5.2.3.3 Consommation des nutriments et leur influence sur la culture	107
5.2.3.4 Suivi du CPR et du Q_{CO2X}	111

5.2.3.5 Saturation de la Perlite ^{MC}	112
5.3 COMPARAISON DES PERFORMANCES DES BIORÉACTEURS	113
5.3.1 CONFIGURATIONS NON-SATISFAISANTES.....	113
5.3.2 COMPARAISON DES PRODUCTIONS DES BIORÉACTEURS TUBULAIRE, PERLITE ^{MC} ET GEL-PAPIER	114
5.4 RÉCOLTE DES BIORÉACTEURS.....	118
5.4.1 BIORÉACTEUR GEL-PAPIER	119
5.4.2 BIORÉACTEUR TUBULAIRE.....	120
5.4.3 BIORÉACTEUR AVEC PERLITE ^{MC}	121
6.0 CONCLUSION	122
7.0 RECOMMANDATIONS	127
RÉFÉRENCES.....	130

LISTE DES TABLEAUX

<u>TABLEAU 2.1</u> PRODUCTIONS DE RACINES TRANSFORMÉES OBTENUES AVEC LES MILIEUX MS ET B5.....	27
<u>TABLEAU 2.2</u> MILIEUX DE CULTURE DE CELLULES VÉGÉTALES.....	29
<u>TABLEAU 2.3</u> PRODUCTION RACINAIRE DE DIFFÉRENTS BIORÉACTEURS.....	35
<u>TABLEAU 4.1</u> PRINCIPALES IMPURETÉS INORGANIQUES DU GELGRO ^{MC} ..	49
<u>TABLEAU 4.2</u> PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE LA PERLITE ^{MC}	54
<u>TABLEAU 4.3</u> COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PERLITE ^{MC}	55
<u>TABLEAU 5.1</u> TEMPS DE CULTURE DES BIORÉACTEURS GEL-PAPIER.....	73
<u>TABLEAU 5.2</u> TEMPS DE CULTURE DES BIORÉACTEURS SANS PAPIER.....	85
<u>TABLEAU 5.3</u> TEMPS DE CULTURE DES TROIS BIORÉACTEURS TUBULAIRES.....	96
<u>TABLEAU 5.4</u> PRODUCTION DE SPORES DE LA PREMIÈRE RÉCOLTE DES BIORÉACTEURS TUBULAIRES.....	97
<u>TABLEAU 5.5</u> RÉCOLTE FINALE DES BIORÉACTEURS TUBULAIRES	98
<u>TABLEAU 5.6</u> TEMPS DE CULTURE DES BIORÉACTEURS LIQUIDES	102
<u>TABLEAU 5.7</u> TEMPS DE CULTURE DES BIORÉACTEURS PERLITE ^{MC}	105

<u>TABLEAU 5.8</u> COMPARAISON DE PRODUCTION DE PROPAGULES DES	
BIORÉACTEURS GEL-PAPIER, TUBULAIRE ET AVEC PERLITE^{MC}	115
<u>TABLEAU 5.9</u> PRODUCTION MOYENNE PAR JOUR DES BIORÉACTEURS	
GEL-PAPIER, TUBULAIRE ET AVEC PERLITE^{MC}	116

LISTE DES FIGURES

<u>FIGURE</u> 2.1 CLASSIFICATION DES M.A.....	8
<u>FIGURE</u> 2.2 VUE D'ARBUSCULES À L'INTÉRIEUR DE RACINES	9
<u>FIGURE</u> 2.3 VÉSICULES DU <i>GLOMUS INTRARADICES</i>	11
<u>FIGURE</u> 2.4 SYNTHÈSE DE LA COLONISATION RACINAIRE PAR LES M.A.	13
<u>FIGURE</u> 2.5 SCHÉMATISATION DE L'OBTENTION DE RACINES TRANSFORMÉES	33
<u>FIGURE</u> 2.6 BIORÉACTEURS TYPES DE L'ÉTUDE DE FAISABILITÉ.....	39
<u>FIGURE</u> 2.7 BIORÉACTEURS DÉVELOPPÉS PAR LE CENTRE DE R&D BIOPRO.	41
<u>FIGURE</u> 4.1 SCHÉMA DU BIORÉACTEUR DE BASE DE CE MÉMOIRE.....	50
<u>FIGURE</u> 4.2 SCHÉMA DU BIORÉACTEUR TUBULAIRE	52
<u>FIGURE</u> 4.3 BIORÉACTEUR AVEC ENCAVURES	53
<u>FIGURE</u> 4.4 SCHÉMA DU MONTAGE POUR LA MESURE DE CO ₂	57
<u>FIGURE</u> 4.5 SUIVI DU CO ₂ PERDU PAR LES FILTRES	59
<u>FIGURE</u> 4.6 COMPARAISON DES DONNÉES ESTIMÉES AVEC LES DONNÉES EXPÉRIMENTALES	61
<u>FIGURE</u> 4.7 MÉTHODE DE COMPTAGE DES SPORES.....	66
<u>FIGURE</u> 4.8 NOMBRE DE PROPAGULES EN FONCTION DU DIAMÈTRE DES GRAINS DE PERLITE ^{MC} FRACTIONNÉS	68

<u>FIGURE 4.8</u> NOMBRE DE PROPAGULES EN FONCTION DU DIAMÈTRE DES GRAINS DE PERLITE^{MC} FRACTIONNÉS	68
<u>FIGURE 5.1</u> RÉSULTATS DES CULTURES EN BIORÉACTEURS GEL-PAPIER AVEC ENCAVURES	75
<u>FIGURE 5.2</u> POURCENTAGE DE COLONISATION RACINAIRE DU BIORÉACTEUR GEL-PAPIER.....	76
<u>FIGURE 5.3</u> PRODUCTION DES BIORÉACTEURS SANS PAPIER	87
<u>FIGURE 5.4</u> COLONISATION RACINAIRE SELON L'ENDROIT DANS LE BIORÉACTEUR GEL-PAPIER.....	93
<u>FIGURE 5.5</u> COLONISATION RACINAIRE SELON L'ENDROIT DANS LE BIORÉACTEUR SANS FRONTIÈRE.....	93
<u>FIGURE 5.6</u> PRODUCTION DES BIORÉACTEURS AVEC MILIEU LIQUIDE.....	103
<u>FIGURE 5.7</u> PRODUCTION DES BIORÉACTEURS AVEC PERLITE^{MC}	108
<u>FIGURE 5.8</u> COLONISATION RACINAIRE DES BIORÉACTEURS AVEC PERLITE^{MC}	109
<u>FIGURE 5.9</u> SATURATION DE LA PERLITE^{MC}	112
<u>FIGURE 5.10</u> CPR ET Q_{CO2X} DES BIORÉACTEURS AVEC PERLITE^{MC}	115

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CO_2^* : Concentration de dioxyde de carbone dans le liquide à l'équilibre avec le gaz
des bioréacteur ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

$\text{CO}_{2 \text{ produit}}$: Concentration de CO_2 produit dans un intervalle de temps fixe ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

CPR : Taux de production de CO_2 ($\text{mmol} \cdot \text{sem}^{-1}$)

K_{La} : Coefficient de transfert des gaz (h^{-1})

K_{pa} : Coefficient de perte des gaz du bioréacteur par les filtres (h^{-1})

$Q_{\text{CO}_2/x}$: Taux spécifique de production de CO_2 ($\text{mmol} \cdot \text{sem}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)

1.0 INTRODUCTION

Dans la nature, il existe des liens très complexes entre chacune des espèces vivantes. Chacune doit, pour survivre, tirer profit de ces différentes interactions. Le monde des plantes n'échappe pas à cette règle. Par exemple, les plantes à fleurs se servent de la mobilité des abeilles pour transporter le pollen et se reproduire. Les abeilles récupèrent, dans ce processus, le pollen des plantes pour en faire des réserves de miel. Ce mutualisme bien connu est un exemple simple des échanges essentiels à la survie de ces deux communautés.

Une forme de relation encore plus étroite se retrouve dans la nature. En effet deux espèces peuvent s'unir afin de maximiser leurs ressources. Cette étroite relation existe entre certains champignons et des plantes. Cette association appelée mycorhization se retrouve chez plus de 90% des plantes (Gianinazzi et Pearson, 1984) et elle est présente dans presque tous les sols (Mosse *et al.*, 1981; Daniels Hetrick, 1984).

Il a été montré que ces champignons jouent le rôle d'un fertilisant naturel. Ils facilitent l'apport aux plantes de nutriments tel le phosphate et l'azote, permettent une tolérance plus grande à la sécheresse et améliorent le mécanisme de défense des plantes face à certains pathogènes (Safir, 1987; Khasa *et al.*, 1990; Aora *et al.*, 1991; Sieverding,

1991). Ils peuvent également permettre une résistance accrue des plantes aux herbicides et insecticides (Menge, 1982; Trappe *et al.*, 1984; Garbaye, 1991; Siqueira, 1991). Cette association du champignon avec les plantes permet donc d'accroître leur croissance. En échange, le champignon obtient des racines, des glucides et d'autres éléments essentiels à sa survie. Cette symbiose avec les plantes est vitale pour le champignon.

Malheureusement, l'homme dans sa quête continue d'une productivité accrue dans tous les domaines provoque des déséquilibres écologiques. Par exemple, les herbicides et fongicides utilisés par les agriculteurs détruisent souvent les champignons mycorhiziens (Abbott et Robson, 1991). Les techniques de culture d'aujourd'hui comme les retournements, l'ajout ou l'enlèvement de sol peuvent aussi diminuer de façon importante la quantité de champignons mycorhiziens (Evans et Miller, 1988; Fairchild et Miller, 1988; Jasper *et al.*, 1989). Il a également été démontré depuis plusieurs années que l'ajout excessif de fertilisants inorganiques, en particulier l'azote et le phosphate, nuit au développement des champignons mycorhiziens (Morrison, 1957; Johnson, 1976; Marx *et al.*, 1976; Stribley et Read, 1976; Moose, Stribley et Letacon, 1981).

Il est quand même ironique de détruire ces champignons, qui sont des fertilisants naturels, par des fertilisants chimiques. Depuis quelques années, des compagnies ont

vu le potentiel économique et écologique des champignons mycorhiziens et ont entrepris des recherches pour mieux les comprendre. Certaines de ces compagnies ont même débuté sa production. Leur objectif est de produire un inoculum qui, additionné aux plantes établit la symbiose.

Vu la nécessité de la plante pour la reproduction du champignon, les techniques de production actuelles se limitent pour l'instant à des co-cultures dans des serres. Ces méthodes sont coûteuses: elles demandent de longs temps de culture, soit de 3 à 4 mois, de très grands espaces et une main d'oeuvre importante.

Il est donc difficile pour ces compagnies d'atteindre économiquement, avec des co-cultures en serres, des productions de champignons mycorhiziens qui peuvent satisfaire le marché potentiel (10^{11} propagules par année) de ce fertilisant naturel. Premier Tech Inc. a donc commandé une étude de faisabilité de production de champignons mycorhiziens en bioréacteur.

Cette étude faite par BIOPRO sur différentes configurations de bioréacteur a donné des résultats positifs (Chavarie *et al.*, 1993). Plus précisément, des productions de spores obtenues des bioréacteurs ($16,7 \text{ spores} \cdot \text{g}^{-1} \text{ racine humide récoltée} \cdot \text{j}^{-1}$ pour 12 semaines de cultures) étaient 3,5 fois supérieures à la production en pots ($4,8 \text{ spores} \cdot \text{g}^{-1} \text{ racine humide récoltée} \cdot \text{j}^{-1}$ pour 12 semaines de cultures) et leur

viabilité plus élevée de 30%. Les travaux de recherche sur la production de champignons mycorhiziens en bioréacteur ont donc été poursuivis et sont présentement en cours à BIOPRO. Les prototypes étudiés antérieurement par cette équipe de recherche ont servi de point de départ au projet de recherche de ce mémoire ciblé sur la mise au point d'un procédé de production de ces champignons.

L'objectif de ce projet de recherche était donc de mieux cerner la performance du bioréacteur gel-papier, qui avait permis d'obtenir la meilleure production de spores, et de modifier sa configuration afin de concevoir un procédé de production de champignons mycorhiziens extrapolable à l'échelle industrielle.

Ce mémoire se présente comme suit. Tout d'abord, une revue bibliographique est présentée pour comprendre comment fonctionne la mycorhization des plantes et discute des méthodes de production déjà développées. À la suite de cette revue, les objectifs de ce projet de recherche sont clairement définis. La section suivante décrit la méthodologie qui a été utilisée afin de répondre aux objectifs. Par la suite, les résultats et les discussions qui s'y rattachent sont divisés en trois parties. Premièrement, les résultats sur l'étude du bioréacteur gel-papier sont analysés. Le second point présente les résultats des autres configurations de bioréacteur développées. Leurs productivités sont comparées dans la troisième partie. Finalement les conclusions et les recommandations complètent ce mémoire.

2.0 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette revue bibliographique est divisée en quatre parties. La première partie est une description des mycorhizes, ainsi que la description du type de mycorhizes visé par cette étude. La section suivante permet de comprendre comment s'établit la symbiose entre la plante et le champignon. Par la suite la revue est orientée vers les différents nutriments ou composés du milieu ou exsudés par la plante qui peuvent influencer la production du champignon. Finalement, les modes de culture utilisés pour la production de champignons mycorhiziens sont étudiés afin d'en faire ressortir les points qui permettront d'établir les bases de conception du procédé de production de champignons mycorhiziens visé.

2.1 CARACTÉRISTIQUES DES MYCORHIZES

Il existe plusieurs types de champignons mycorhiziens regroupés à l'intérieur de deux grandes familles: les ectomycorhizes et les endomycorhizes (Mosse *et al.*, 1981). Les ectomycorhizes forment un manchon autour de la racine et la pénètrent, à l'aide d'hyphes, entre les cellules des tissus racinaires. Plusieurs familles d'arbres des forêts boréales et tempérées sont colonisées par ce type de champignon.

Les endomycorhizes ont en commun l'absence d'enveloppe extérieure et la capacité de leurs hyphes de pénétrer à l'intérieur des cellules des racines. Il existe différents types de symbiose endomycorhizienne, celle qui fait l'objet de cette étude concerne les champignons M.A. ou mycorhizes arbusculaires (Gianinazzi-Pearson, 1984). Il est impossible de reconnaître cette dernière forme sans une coloration des racines, à l'exception d'une légère teinte jaunâtre occasionnelle des racines de certaines plantes hôtes (Mosse *et al.*, 1981). L'ensemble du réseau mycélien ne forme généralement qu'une seule cellule multinucléée sans septation (Mosse *et al.*, 1981; Kendrick, 1985) et la partie intraracinaire se retrouve en général dans le cortex primaire des racines.

2.2 CARACTÉRISTIQUES DU SYMBIOTE ENDOMYCORHIZE-PLANTE

2.2.1 DESCRIPTION BIOLOGIQUE DE LA SYMBIOSE ENDOMYCORHIZIENNE AVEC LES PLANTES

Les M.A. se retrouvent sous quatre formes: les spores qui se retrouvent uniquement à l'extérieur des racines, les hyphes qui se développent à l'extérieur et à l'intérieur des racines, les arbuscules qui se retrouvent dans les cellules racinaires et les vésicules qui se développent entre les cellules des racines.

Les spores et les vésicules ont la même utilité, soit l'accumulation de réserves énergétiques et génétiques pour une germination qui pourra éventuellement conduire à la colonisation d'une nouvelle racine. Les hyphes et les arbuscules servent aux échanges nutritionnels entre leur environnement immédiat et les racines.

2.2.1.1 Les spores

Les spores produites à l'extérieur des racines contiennent les réserves nécessaires pour la production d'un tube germinatif. Ce tube cherche à établir une mycorhization avec une racine puisque ses réserves nutritives ne permettent pas sa survie à long terme. La dimension des spores varie selon l'espèce du champignon. Elles peuvent être de quelques dizaines de microns, pour les *Glomus*, à quelques millimètres pour *Gigaspora gigantea*.

Les espèces des M.A. sont différenciées par leur structure membranaire, la morphologie des vésicules, la présence ou non de sporocarpes (multitudes de spores regroupées formant une excroissance à la surface des racines), la taille et la couleur des spores ou une combinaison de ces facteurs. Le schéma qui se retrouve à la Figure 2.1 montre la classification des champignons endomycorhiziens (Simon *et al.*, 1993).

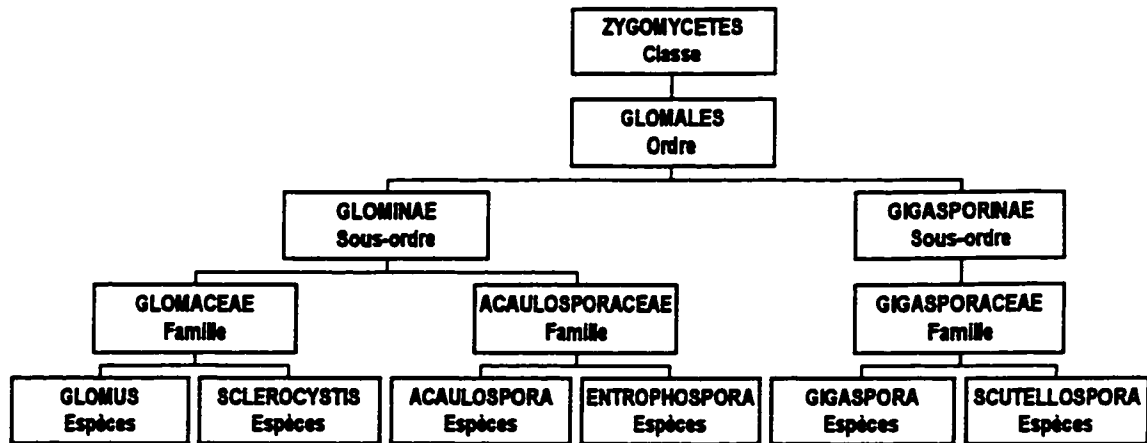


FIGURE 2.1 CLASSIFICATION DES M.A.

2.2.1.2 Les hyphes

Les hyphes extraracinaires permettent aux champignons d'aller à la recherche de racines, de nutriments ainsi qu'une reproduction sur une plus grande distance. Les hyphes intraracinaires se retrouvent dans les espaces extracellulaires, pour ensuite pénétrer la membrane où il y aura une arborescence de l'hyphe (multitude de petits hyphes sous la forme d'un arbre).

2.2.1.3 Les arbuscules

Une quantité importante de nouveaux hyphes à l'intérieur d'une même cellule de la racine est appelée arbuscule. Ces petits hyphes serviront aux échanges d'éléments nutritifs entre la plante et le champignon. Il est possible de voir à la Figure 2.2 des arbuscules de *Glomus intraradices* à l'intérieur de racines *Daucus carota* cultivées dans cette étude.



FIGURE 2.2 VUE D'ARBUSCULES À L'INTÉRIEUR DE RACINES

2.2.1.4 Les vésicules

Les vésicules contiennent des réserves génétiques et nutritionnelles emmagasinées par les M.A.. Ces vésicules se retrouvent entre les cellules des racines et peuvent comme les spores permettre la colonisation de nouvelles racines. Il est donc possible de prendre des sections de racines avec des vésicules et de les faire germer afin de coloniser de nouvelles racines. Le pouvoir de colonisation des vésicules est aussi efficace que celui des spores sinon plus puisqu'elles sont protégées par l'enveloppe racinaire (Bierman et Linderman, 1983). Certaines espèces d'endomycorhizes à arbuscules ne produisent pas de vésicules, par exemple *Gigaspora margarita* et *Gigaspora gigantea* (Bierman et Linderman, 1983). La Figure 2.3 montre des vésicules du champignon *Glomus intraradices* à l'intérieur d'une racine de *Daucus carota* cultivée dans cette étude.



FIGURE 2.3 VÉSICULES DU *GLOMUS INTRARADICES*

2.2.1.5 Schématisation de la colonisation d'une racine par les M.A.

La Figure 2.4, illustre le processus de mycorhization entre une racine et un champignon M.A.. Il y a d'abord germination d'une spore ou d'une vésicule (a). Le tube germinatif se dirige vers une racine (b). Il y a ensuite pénétration de la racine par un hyphe (c), en général secondaire. Cette étape est décisive dans le processus de mycorhization. En effet, si aucun hyphe ne parvient à pénétrer la racine, il y a mort du champignon. Quelques hypothèses, qui seront élaborées à la section 2.2.3 concernant la présence d'éléments inhibiteurs ou stimulants favorisant cette pénétration ont été émises. Après la pénétration, il y a formation d'arbuscules à l'intérieur des cellules racinaires pour permettre l'échange symbiotique, comme montré en d). Finalement en e), le champignon se fait des réserves pour sa reproduction qu'il emmagasine dans les vésicules intraracinaires et dans les spores extraracinaires.

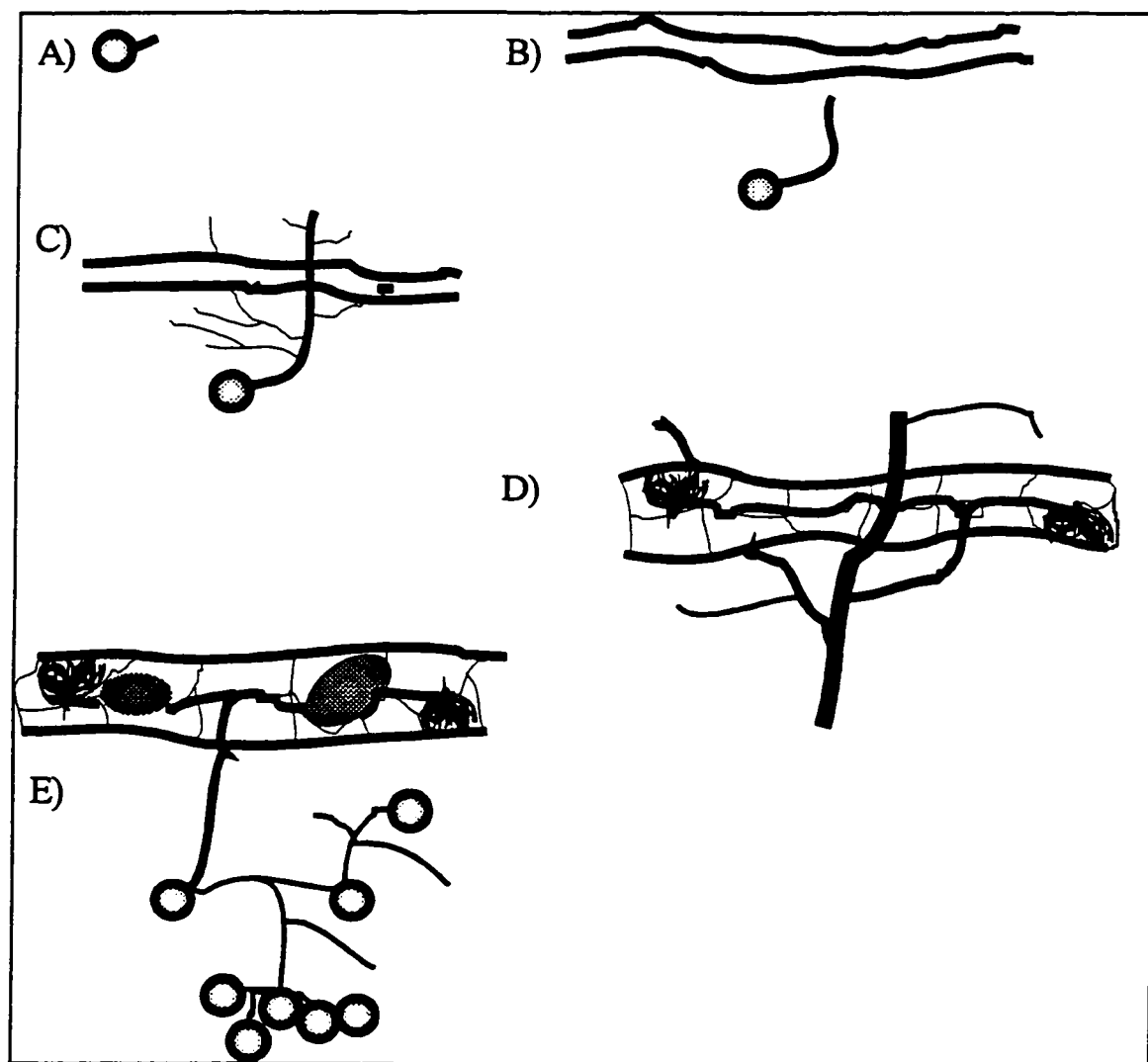


FIGURE 2.4 SYNTHÈSE DE LA COLONISATION RACINAIRE PAR LES M.A.

2.2.2 EFFET BÉNÉFIQUE DE LA SYMBIOSE ENTRE LES PLANTES ET LES M.A.

L'inoculation des plantes avec des M.A. permet, dans un sol faiblement fertilisé, d'accroître leur croissance comparativement à celles non-mycorhizées. Ce phénomène a été démontré pour plusieurs espèces de plantes, tel le maïs (Gerdemann, 1965), les haricots (Daft et El-Giahmi, 1974), les légumes en général (Crush, 1974), la plante *Atriplex canescens* (Williams *et al.*, 1974), le coton (Rich et Bird, 1974), les agrumes (Marx *et al.*, 1971; Kleinschmidt et Gerdemann, 1972; Hattingh et Gerdemann, 1975), le blé (Khan, 1975), le trèfle (Abbott et Robson, 1977) et pour beaucoup d'autres espèces de plantes (Bowen et Rovira, 1969; Gray et Gerdemann, 1969; Harley, 1969; Mosse 1973; Khan, 1975). Les M.A. peuvent également augmenter la production du soja (Ross, 1971; Schenck et Hinson, 1973), des fraises (Daft et Okusanya, 1973) et des pétunias (Daft et Okusanya, 1973).

La symbiose plante-endomycorhize est profitable aux deux organismes à différents degrés selon l'espèce du champignon et la plante impliquée. Abbott et Robson (1977) ont montré une croissance de la plante plus importante (171%) et une accumulation de phosphate accrue (238%) pour une variété de trèfle mycorhizées avec le champignon *Glomus mosseae* comparativement aux plantes mycorhizées avec le champignon *Glomus fasciculatus* et aux plantes témoins. Ils ont montré que les plantes colonisées avec *Glomus fasciculatus* ont une croissance et une accumulation de phosphate

identique ou plus faible que les témoins non-mycorhizés. Le choix du champignon inoculé en fonction de la plante visée semble donc très important puisque la symbiose peut s'avérer inutile ou néfaste à la plante.

2.2.3 FACTEURS INFLUENÇANT LA COLONISATION RACINAIRE

Avant qu'il y ait symbiose entre les deux organismes, il faut qu'il y ait reconnaissance, contact et pénétration à l'intérieur des racines. Plusieurs facteurs peuvent aider ou nuire à la colonisation des racines par les M.A. Cette section présente une revue des différentes hypothèses émises sur cet aspect important de la mycorhization.

Le phénomène de reconnaissance existe entre les plantes et les endomycorhizes. Les champignons endomycorhiziens peuvent reconnaître la présence de racines mycorhizables. Bécard et Piché (1990) ont observé que la croissance des hyphes peut être stimulée par la présence d'exsudats racinaires. Ils ont également montré que la présence de CO₂ produit par la respiration des plantes peut augmenter la croissance mycélienne (Bécard et Piché, 1989b). Bonfante-Fasolo et Gianinazzi-Pearson (1982) ont vu un développement très abondant de cils sur la surface externe des hyphes du champignon *Pezizella ericae* avec la présence de racines de *Calluna vulgaris*. Ces cils ne sont, en général, pas présents dans une culture sans présence de racines. Ce type de reconnaissance rappelle les observations faites pour d'autres types d'association entre

les plantes et d'autres micro-organismes comme les *Rhizobiums* avec des légumineuses (Callow, 1975; Murray et Maxwell, 1975; Mengden, 1978; Dazzo, 1980).

La reconnaissance des M.A. par les plantes existe également. Il a été présenté par Gemma et Koske (1988) que les racines réagissent à la présence des M.A.. Ils ont remarqué une augmentation importante des racines latérales de tomates en présence de tubes germinatifs du champignon *Gigaspora gigantea*. Donc, pour qu'il y ait colonisation, des substances qui permettent aux organismes de se reconnaître doivent être présentes. Les phénomènes de reconnaissance entre les champignons endomycorhiziens et les plantes hôtes ont été bien démontrés, mais les signaux biologiques ou chimiques impliqués dans ce processus ne sont pas encore clairement identifiés.

Certaines plantes sont peu influencées par la présence du champignon. Il existe même des plantes dites non-mycorhizables, c'est-à-dire que la présence des champignons est très rarement ou jamais détectée à l'intérieur de leurs racines. Les études réalisées jusqu'à ce jour ne montrent pas clairement quelles sont les raisons qui empêchent la mycorhization d'avoir lieu. Plusieurs hypothèses ont cependant été émises afin d'expliquer cette résistance à la mycorhization. Tester *et al.* (1987) ont fait une revue de certaines de ces hypothèses énoncées avant 1987. Plusieurs études tentent de montrer que les racines de ces plantes dégageraient des substances toxiques aux

champignons (Morley et Mosse, 1976; Tommerup, 1984; Glenn *et al.*, 1988; El-Atrach *et al.*, 1989). Tommerup (1984) a trouvé des produits volatiles ou solubles qui inhiberaient la croissance mycélienne. D'autres auteurs suggèrent que des exsudats racinaires diminueraient la croissance mycélienne, empêchant ainsi une infection subséquente (Schwab *et al.*, 1982, 1984; Hayman, 1983; Nemec et Tucker, 1983).

Des expériences ont été réalisées pour démontrer ce phénomène de toxicité des plantes non-mycorhizables. Ces dernières ont été placées avec des plantes mycorhizables et un champignon. Le contact entre les deux types de plantes a montré une baisse de colonisation des mycorhizables (Hayman *et al.*, 1975; Iqbal et Qureshi, 1976). St-Arnaud *et al.* (1996) ont émis l'hypothèse que le développement plus important de spores dans le côté sans racine d'une boîte de Pétri à deux compartiments est dû à l'absence de substances inhibitrices exsudées par les racines. Ocampo *et al.* (1980) ont cependant montré que cet effet n'était pas constant. D'autres travaux sur des plantes non-mycorhizables placées avec des champignons n'ont pas montré de baisse de germination des spores ni de croissance de leurs hyphes (Daniels et Trappe, 1980; Bécard et Piché, 1989a). Il n'est pas encore prouvé que les plantes non-mycorhizables dégagent des substances toxiques pour les champignons.

Cependant des observations faites par Trinick (1977); Hirrel *et al.* (1978); Ocampo *et al.* (1980) et Miller *et al.* (1983) ont montré que des plantes dites non-mycorhizables

pouvaient être colonisées quand elles étaient mises en présence de plantes mycorhizables. Plusieurs de ces espèces reconnues non-mycorhizables ont cependant montré des signes de colonisation (Tester *et al.*, 1987). Il est donc difficile de conclure que la présence de plantes colonisées permet la mycorhization de plantes non-mycorhizables. Ces travaux suggèrent plutôt que les plantes mycorhizables exsuderaient des produits qui stimulent le champignon.

Des essais réalisés par Bécard et Piché (1989a) montrent que la présence de racines de betterave, plante non-mycorhizable, ne stimule pas la croissance des hyphes du champignon comme le font les racines de plantes hôtes comme les carottes. La germination des spores et la croissance mycélienne se comportent comme dans les témoins sans présence de racines. Ils ont donc conclu que cette plante ne produisait pas de produits volatils ou solubles donnant un signal nécessaire à une croissance mycélienne accrue en vue d'une infection ultérieure.

Tester *et al.* (1987) ont aussi suggéré un contrôle mécanique ou chimique plus tard durant l'interaction entre les deux organismes qui pourrait empêcher la pénétration des hyphes à l'intérieur du cortex racinaire. Plusieurs études montrent que les hyphes peuvent passer sur les racines des plantes non-mycorhizables sans qu'il y ait pénétration par le champignon (Theodorou et Bowen, 1971; Bevege et Bowen, 1975; Trinick, 1977; Hirrel *et al.*, 1978; Ocampo *et al.*, 1980; Schwab *et al.*, 1984).

Cependant ce phénomène a aussi été observé à plusieurs reprises pour des plantes mycorhizables.

Le mécanisme qui permet la symbiose entre les deux organismes n'est donc pas encore connu. Il est probable que l'effet cumulatif des différents phénomènes suggérés régit la mycorhization. Bécard et Piché (1989b) ont montré que des signaux, tel le CO₂, augmentent la germination des propagules. Il est donc possible que le champignon ait besoin de sentir la présence de racines près de lui pour qu'il y ait germination puisque sa survie sans la possibilité d'une symbiose est très courte. De plus, le champignon trouverait peut-être dans les exsudats racinaires des nutriments additionnels pour sa croissance ou tout simplement un signal pour se rendre jusqu'aux racines plus rapidement.

D'autres facteurs peuvent aider la colonisation des racines par les M.A. La proximité entre les M.A. et les racines joue un rôle lors de la mycorhization. Les tubes germinatifs ont une durée de vie limitée. Ils doivent rencontrer leurs hôtes le plus rapidement possible après avoir reçu le signal de la présence de racines mycorhizables. Il est donc évident que la quantité de spores ou de vésicules de champignons présents pour la colonisation et leur proximité des racines est d'une grande importance dans le degré de mycorhization des plantes (Carling *et al.*, 1979; Warner et Mosse, 1980; Mosse *et al.*, 1981).

2.3 ASPECTS NUTRITIONNELS

La section précédente présentait les principaux facteurs qui influencent la colonisation des racines par les M.A. Cette section énumère les nutriments disponibles dans l'environnement qui jouent également un rôle sur la mycorhization entre les deux symbiotes.

2.3.1 LES NUTRIMENTS IMPLIQUÉS DANS LA COLONISATION RACINAIRE

2.3.1.1 Le phosphore

Plusieurs travaux de recherche (Ross, 1971; Mosse, 1973; Johnson, 1976; Sparling et Tinker, 1978; Stribley, Tinker et Snellgrove, 1980; Plenchette, Furlan et Fortin, 1983; Siqueria, Hubbell et Valle, 1984, Thompson, Robson et Abbott, 1986; Amijee, Tinker et Stribley, 1989) ont permis de montrer que la concentration de phosphore initiale avait une influence sur le pourcentage de colonisation des racines par les champignons endomycorhiziens à arbuscules et vésicules. Ces chercheurs ont observé que de faibles ajouts de phosphore augmentaient la colonisation racinaire par les M.A., mais ce

pourcentage diminuait de façon radicale quand cette concentration était trop importante.

Johnson (1976) montre que la longueur totale des racines des plantes (*Fuchsia*, *Coprosma*, *Griselinia*) colonisées par le champignon *Acaulospora laevis* augmente en moyenne de 41% quand la concentration de départ en phosphore, passe de $0,35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ à $0,45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Il a également observé que ce pourcentage chute de 75% quand la concentration initiale dépasse $0,80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Abbott *et al.* (1984) ont démontré qu'une concentration initiale de $0,55 \text{ mmol}$ de phosphore $\cdot \text{kg}^{-1}$ de sol permettait d'accentuer le pourcentage de colonisation racinaire de *Trifolium subterraneum* inoculées par l'espèce de M.A. *Glomus fasciculatum* de 12%. Encore une fois leurs travaux soulignent qu'une concentration initiale supérieure à $0,97 \text{ mmol}$ de phosphore $\cdot \text{kg}^{-1}$ de sol diminuait de 85% le pourcentage de colonisation racinaire.

Amijee *et al.* (1989) ont remarqué que la longueur totale des racines d'*Allium porrum*, colonisées par le champignon *Glomus mosseae* augmente de 30% quand la concentration en phosphore initiale passe de $0,09 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de sol à $0,30 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de sol. Leurs travaux ont également montré qu'il y avait une baisse

de 83% des racines colonisées quand la concentration de phosphore au temps zéro dépassait $0,97 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de sol.

Toutes ces études ne présentent que le phosphore ajouté au sol au début de l'expérience sans suivi de la variation de la concentration dans le temps. Le phosphore est consommé et par conséquent il diminue dans le milieu. Il est donc impossible dans ces études de déceler quelle est la concentration de phosphore optimale pour la production de champignons endomycorhiziens. Cependant ces auteurs s'entendent sur le fait que le pourcentage de racines colonisées est fonction de la quantité de phosphore présent dans le milieu.

2.3.1.2 L'azote

Tout comme le phosphore, l'azote a une influence sur le taux de colonisation racinaire par les M.A.. Une étude menée par Chambers *et al.* (1980) montre que des ajouts importants d'azote dans le sol peuvent diminuer la colonisation de l'espèce *Trifolium subterraneum* par le M.A. *Glomus mosseae*. Ils ont également remarqué que la forme de l'azote ajouté a une influence sur le taux de colonisation. Leurs travaux montrent qu'un ajout de $2,0 \text{ mmol}$ d'azote $\cdot \text{kg}^{-1}$ de sol sous la forme de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ abaissait le

pourcentage de colonisation de 37% et qu'il fallait un ajout de $8,0 \text{ mmol d'azote} \cdot \text{kg}^{-1}$ de sol sous la forme de NaNO_3 pour obtenir une chute de colonisation équivalente.

Les travaux de Thompson *et al.* (1986) précisent que l'influence de l'azote sur la colonisation est fonction des espèces qui prennent part à la symbiose. Il a fait varier la concentration initiale de NO_3 de $0,18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ à $1,84 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. La colonisation du maïs par le M.A. *Glomus mosseae* augmente alors de 33%. Cependant ce changement dans la concentration de NO_3 pour la symbiose entre le maïs et *Glomus fasciculatum* provoque une baisse de 70% de la colonisation racinaire. Pour le blé en symbiose avec *Glomus mossea*, cette augmentation de NO_3 entraîne un arrêt complet de la mycorhization. Finalement cette différence de concentration n'a pas d'influence sur le pourcentage de colonisation du blé avec *Glomus fasciculatum*. Cette étude montre également que le pourcentage de racines colonisées varie selon le rapport entre NO_3 et NH_4 . Encore une fois l'influence de ce rapport sur la colonisation dépend des espèces. Cependant les colonisations sont près de zéro lorsque seul du NH_4 est utilisé comme source d'azote.

Tout comme le phosphore, l'azote doit être suivi durant les cultures de production de champignons endomycorhiziens afin de déterminer si ces ions sont des facteurs déterminants qui influencent la production.

2.3.1.3 Le carbone

Pearson et Read (1973) ont démontré que les champignons endomycorhiziens dépendent de la plante hôte pour leur approvisionnement en glucides nécessaires à leur développement. Nelson (1964) a observé que le carbone était transféré des plantes aux M.A. par les racines. Il a marqué du sucrose au [^{14}C] et comparé les pourcentages de [^{14}C] des plantes mycorhizées et non-mycorhizées. Après 12 heures, les plantes non-mycorhizées montrent que 95% du [^{14}C] est localisé dans la plante et 5% dans les racines. Dans les plantes mycorhizées, la distribution du [^{14}C] devient 46% dans la plante et 54% dans les racines.

Bécard et Fortin (1988) mentionnent que la concentration en sucrose a une influence sur le nombre de point d'entrée des M.A. à l'intérieur des racines cultivées de façon in vitro. Une augmentation de la concentration initiale de 10 g de sucrose \bullet L $^{-1}$ à 30 g \bullet L $^{-1}$ occasionne une chute de 90% de la mycorhization. Encore une fois, la concentration initiale en sucrose ne doit pas être trop élevée afin d'optimiser la production des endomycorhizes.

2.3.1.4 Le sulfate de sodium

Le sulfate de sodium $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ est un autre nutriment qui semble influencer les pourcentages de mycorhization des racines. Bécard et Fortin (1988) ont observé que la présence de ce nutriment ($1,41 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) provoque une baisse de 40% de la colonisation racinaire.

Dans le milieu de culture qu'ils utilisaient il y a une autre source de sulfate ($3,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) et le Bacto Agar qu'ils utilisaient pour gélifier leur milieu contient du sodium ($< 0,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). Il semble donc que ce soit le sodium, présent dans le Na_2SO_4 ajouté, qui serait responsable de cette baisse de colonisation.

Chambers *et al.* (1980) ont également observé une baisse de la colonisation racinaire avec l'augmentation de la concentration initiale de NaSO_4 . La colonisation des racines de *Trifolium subterraneum* a baissé de 74 % pour une concentration initiale 4 fois plus élevée (2 mmol à $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Toutes ces études montrent que la concentration des nutriments présents dans le milieu de culture a une influence directe sur la production de champignons endomycorhiziens. Il est donc important de choisir des concentrations initiales appropriées aux couples

symbiotiques cultivés et de faire le suivi de tous les nutriments afin d'en faire un contrôle maximisant la production. Le suivi de la consommation des nutriments par les symbiotes, qui n'a jamais été réalisé pour ce type de culture, permettra une meilleure compréhension de la symbiose plantes-champignons. Cette approche originale pourrait également mener à la modélisation de la production de champignons endomycorhiziens.

2.3.2 MILIEUX DE CULTURES

Plusieurs milieux de cultures ont déjà été développés pour la croissance de cellules végétales. Le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) est un milieu riche en sucre (3% ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)) et en sels minéraux. Ce milieu est utilisé pour la croissance des racines transformées sur milieu gélosé (1% agar), en milieu liquide dans des flacons agités et en bioréacteur (Weathers et Cheetham, 1988; Taya *et al.*, 1989 (0,3 L); Sharp et Doran, 1990 (2,5 L); Whitney, 1992 (35 L); Uozumi et Kobayashi, 1994 (1 L)). Hilton et Rhodes (1990) ont opté pour le milieu B5 sans hormone pour leurs cultures en bioréacteur de 14 L de racines transformées génétiquement. La transformation de ces racines permet de cultiver uniquement la partie racinaire. Les mécanismes d'obtention de ce type de racines et leurs avantages sont décrits à la section suivante (2.4.1).

Ces milieux de culture donnent de très bon taux de production de racines chevelues transformées. Le tableau 2.1 présente les productions de racines transformées obtenues par quelques auteurs.

TABLEAU 2.1 PRODUCTIONS DE RACINES TRANSFORMÉES OBTENUES AVEC LES MILIEUX MS ET B5

Espèces de racines transformées et milieu utilisé	Production de racines	Production moyenne de racines	Référence
<i>Armoracia rusticana</i> MS	11 g _{sec} • L ⁻¹ en 4,5 sem	0,35 g _{sec} • L ⁻¹ • j ⁻¹	Taya <i>et al.</i> , 1989
<i>Atropa belladonna</i> MS	1,3 g _{sec} • L ⁻¹ en 3 sem	0,06 g _{sec} • L ⁻¹ • j ⁻¹	Sharp et Doran, 1990
<i>Nicotiana tabacum</i> MS	127 g _{humides} • L ⁻¹ en 4 sem	4,53 g _{humides} • L ⁻¹ • j ⁻¹	Whitney, 1992
<i>Datura stramonium</i> B5	134 g _{humides} • L ⁻¹ en 5,7 sem	3,35 g _{humides} • L ⁻¹ • j ⁻¹	Hilton et Rhodes 1990

Les milieux très riches MS et B5, dont la composition se retrouve au tableau 2.2, ne sont cependant pas adéquats pour des productions de racines chevelues transformées

mycorhizées puisque de fortes concentrations de phosphore, d'azote, de sucre et de sulfate de sodium sont néfastes pour le développement du champignon.

Bécard et Fortin (1988) ont modifié certains nutriments d'un milieu typique de culture de cellules végétales afin qu'il favorise le développement du champignon. Le milieu choisi comme base était le White modifié (Tableau 2.2). Leurs résultats confirment que des concentrations limitées en sucre, en phosphate, en azote et nulle en sulfate de sodium permettent une augmentation des points de colonisation racinaire sans affecter leur croissance. Ce milieu est maintenant utilisé de façon courante pour la culture in vitro de racines transformées mycorhizées. Ce milieu est appelé M (Tableau 2.2) parce que les concentrations de PO_4 , de NO_3 et de sucres sont minimales.

TABLEAU 2.2 MILIEUX DE CULTURE DE CELLULES VÉGÉTALES

Composés	MW ^a		MS ^b		B5 ^c		M ^a	
Macronutriments	mg • L ⁻¹	mM	mg • L ⁻¹	mM	mg • L ⁻¹	mM	mg • L ⁻¹	mM
MgSO ₄ •7H ₂ O	731	3,0	370	1,5	250	1,0	731	3,0
Na ₂ SO ₄ •10H ₂ O	453	1,4	-	-	-	-	-	-
KNO ₃	80	0,8	1900	18,8	2500	25	80	0,8
KCl	65	0,9	-	-	-	-	65	0,8
NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	21,5	0,15	-	-	150	1,1	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	170	1,2	-	-	4,8	0,04
NH ₄ NO ₃	-	-	1650	20,6	-	-	-	-
CaCl ₂ •2H ₂ O	440	3,0	-	-	150	1,0	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	134	1,0	-	-
Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	288	1,2	-	-	-	-	288	1,2

TABLEAU 2.2 (SUIITE)

Composés	MW ^a		MS ^b		B5 ^c		M ^a	
Micronutriments	mg • L ⁻¹	μM	mg • L ⁻¹	μM	mg • L ⁻¹	μM	mg • L ⁻¹	μM
NaFeEDTA	8	18,6	43	100	43	100	8	18,6
KI	0,75	4,5	0,83	5,0	0,75	4,5	0,75	4,5
MnSO ₄ •4H ₂ O	-	-	22,3	100	-	-	-	-
MnSO ₄ •H ₂ O	-	-	-	-	10	60	-	-
MnCl ₂ •4H ₂ O	6	30	-	-	-	-	6	30
ZnSO ₄ •7H ₂ O	2,65	9,2	8,6	30	2,0	7,0	2,65	9,2
H ₃ BO ₃	1,5	25	6,2	100	3,0	50	1,5	25
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,13	0,52	0,025	0,1	0,025	0,1	0,13	0,52
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,0024		0,25	1,0	0,25	1,0	0,0024	0,01
CoCl ₂ •6H ₂ O	-	-	0,025	0,1	0,025	0,01	-	-
Sucrose	30000		30000		20000		10000	
pH	5,5		5,7		5,5		5,5	

TABLEAU 2.2 (SUITE)

Composés	MW ^a	MS ^b	B5 ^c	M ^a
Vitamines et hormones	mg • L ⁻¹	mg • L ⁻¹	mg • L ⁻¹	mg • L ⁻¹
Glycine	3,0	-	-	3,0
ThiamineHCl	0,1	0,1	10,0	0,1
PyridoxineHCl	0,1	0,5	1,0	0,1
acide nicotinique	0,5	0,5	1,0	0,5
Inositol	50	100	100	50
IAA	-	1-30	-	-
Kinétine	-	0,04-10	0,1	-
2,4-D	-	-	0,1-1,0	-
a) Bécard et Fortin (1988)				
b) Murashige et Skoog, (1962)				
c) Gamborg <i>et al.</i> (1968)				

2.4 TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO DES CHAMPIGNONS ENDOMYCORHIZIENS

La reproduction du champignon en co-cultures est en général réalisée avec des plantes entières dans des chambres de culture ou dans des serres. Ces plantes prennent

beaucoup d'espace et un long temps de culture, ce qui limite les études possibles. Puisque la symbiose se situe dans les racines des plantes, il est souhaitable de ne cultiver que cette partie de la plante. La technique de transformation des racines, déjà bien connue, qui ne produit que des racines a été utilisée à cette fin.

2.4.1 LES RACINES HÔTES TRANSFORMÉES

Il est possible d'obtenir des racines chevelues par une transformation génétique de tissus de plantes avec la bactérie du sol *Agrobacterium rhizogenes*. Cette bactérie est capable d'infecter un grand nombre de plantes dicotylédones. Mugnier (1988) en dresse une liste de 80 provenant de 29 familles pouvant être transformées.

La Figure 2.5 (Uozumi et Kobayashi, 1994) illustre comment s'effectue la transformation des plantes afin d'obtenir des racines transformées. Des parties de la plante sont placées aseptiquement avec une souche d'*Agrobacterium rhizogenes*. La transformation de la plante se fait par le transfert, l'intégration et l'expression dans le génome des cellules de la plante d'un large plasmide provenant des bactéries appelées Ri ("root inducing") (Chilton et al., 1982; Binns et Thomashow, 1988). Après une culture d'une à quatre semaines, des racines émergent du site d'inoculation. Elles sont coupées et transférées sur un milieu de culture sans hormones de croissance, comme

MS, B5 ou MW (Tableau 2.2). À ce milieu est ajouté un antibiotique afin d'éliminer la bactérie.

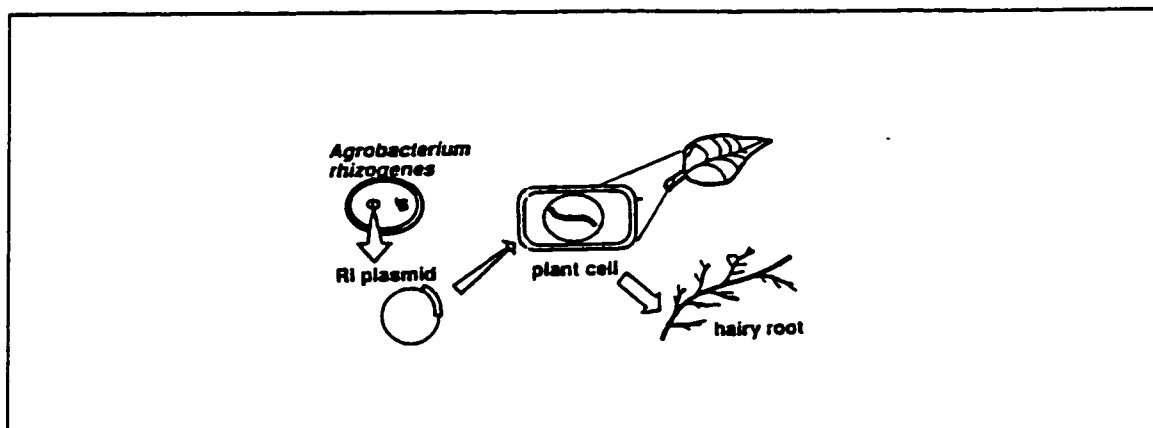


FIGURE 2.5 SCHÉMATISATION DE L'OBTENTION DE RACINES TRANSFORMÉES

Les racines chevelues ainsi obtenues possèdent une grande quantité d'embranchements latéraux, une profusion de poils et un géotropisme inversé, c'est-à-dire qu'elles poussent vers le haut. Le protocole pour obtenir des racines chevelues transformées est décrit par Hamil *et al.* (1987) et Rhodes *et al.* (1987). Bécard et Fortin (1988) décrivent comment obtenir des racines chevelues transformées et mycorhizées de carotte avec une souche d'*Agrobacterium rhizogenes*.

Ces racines sont cultivées en flacons agités ou dans des boîtes de Pétri au moyen de milieux de culture solides ou liquides adéquats pour le développement des racines et du champignon.

2.4.2 TYPES DE CULTURE DE RACINES CHEVELUES TRANSFORMÉES

Comme pour plusieurs types de cellules de plantes, la croissance des racines chevelues peut se faire en flacons agités. Cette méthode de culture donne de très bons résultats à petite échelle. Cependant les cultures à grande échelle s'effectuent en bioréacteurs. Les premiers essais faits par Wilson *et al.* (1987) dans des bioréacteurs agités standards (STR) ont été désastreux. Les racines se différenciaient en cals, puisque leurs contacts avec les pales (turbine Rushton) étaient trop violents. Afin de remédier à ce problème, Hilton et Rhodes (1990) ont séparé les racines des pales du bioréacteur agité standard par un grillage en acier inoxydable. Ils ont obtenu une production moyenne de $0,21 \text{ g}_{\text{sec}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ de la plante *Datura stramonium* pour 40 jours de culture à l'aide d'un bioréacteur de 12 L.

Taya *et al.* (1989) ont obtenu une production moyenne de $0,35 \text{ g}_{\text{sec}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ de racines chevelues transformées de la plante *Armoracia rusticana* pour 31 jours de culture avec

un bioréacteur de type gazosiphon de 0,3 L possédant une membrane en polyuréthane servant de support immobilisateur aux racines.

Weathers et Cheetham (1988), Hokama *et al.* (1990) et Whitney (1990) ont opté pour des bioréacteurs brouillards et des lits percolants. La percolation du liquide à l'intérieur de la masse racinaire permet un bon transfert des nutriments. Ces bioréacteurs permettent également d'augmenter le taux de transfert d'oxygène. Whitney (1992) montre que le rendement de production de racines *Nicotiana tabacum* en brouillard est supérieur à tous les autres types de cultures. Le Tableau 2.3 résume les productions qu'il a obtenues pour 28 jours de culture.

TABLEAU 2.3 PRODUCTION RACINAIRE DE DIFFÉRENTS BIOREACTEURS

Type de bioréacteur	Production moyenne ($\text{g}_{\text{humides}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$)
Flacon agité	3,5
Flacon aéré	3,1
Gazosiphon	6,6
Lit percolant	4,2
Brouillard	9,1

Il existe donc des technologies de culture de racines transformées. Cependant il n'existe aucun bioréacteur de production de racines transformées et mycorhizées.

Toutes les cultures se font présentement dans des flacons agités et en boîtes de Pétri. Seul, une étude de faisabilité d'un bioréacteur de production de racines transformées mycorhizées a été réalisée par Chavarie *et al.* (1993) et par Jolicoeur *et al.* (1993).

2.4.3 MODES DE CULTURE DES SYMBIOTES.

Bécard et Fortin (1988) cultivent leurs symbiotes dans des boîtes de Pétri conventionnels avec le milieu nutritif minimal gélifié qu'ils ont développé. St-Arnaud *et al.* (1996) ont opté pour une nouvelle approche avec un Pétri à deux compartiments. Ce Pétri permet de confiner les racines dans un des compartiments. L'autre permet la prolifération du champignon qui arrive à passer la frontière qui sépare les deux compartiments. Ce type de culture permet une production moyenne de 4 spores \bullet mm⁻² du champignon *Glomus intraradices* vivant en symbiose avec des racines de *Daucus carota* du côté sans racine de la boîte de Pétri à deux compartiments avec des pointes de production allant jusqu'à 12 spores \bullet mm⁻² comparativement à 2 spores \bullet mm⁻² du côté de la boîte de Pétri où sont les racines.

Ce genre de culture ouvre la voie à un nouveau mode de production du champignon. Il est cependant difficile de l'extrapoler directement à l'échelle industrielle. La

conception d'un bioréacteur de production peut cependant s'inspirer de la ségrégation entre les deux organismes qui semble bénéfique à la prolifération du champignon.

L'étude de faisabilité de Chavarie *et al.* (1993), le brevet de Fortin *et al.* (1993) et le rapport d'avancement des travaux du Centre de recherche (Jolicoeur *et al.*, 1993) montrent plusieurs configurations de bioréacteurs prometteuses. La Figure 2.6 illustre les bioréacteurs de l'étude de Chavarie *et al.* (1993).

Le premier bioréacteur (a) tente d'extrapoler le Pétri à deux compartiments. Un grillage en acier inoxydable sert de frontière entre les racines et le milieu de culture solide. La production moyenne de spores de *Glomus intraradices* a été de $37 \text{ spores} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{humides}} \cdot \text{j}^{-1}$ de racines de *Daucus carota* inoculées pour 81 jours de cultures. Pour la première fois les racines recueillies, contenaient des chapelets de vésicules.

Dans le brevet de Fortin *et al.* (1993), il est indiqué qu'il est possible de remplacer le grillage par une feuille de cellulose afin de créer l'effet de frontière désiré. Les résultats en boîtes de Pétri montrent des rendements de production de spores deux fois plus élevés avec la présence d'une feuille de papier à la surface du gel plutôt qu'un grillage d'acier. Cependant, aucun résultat de production en bioréacteur n'a été publié.

Un second bioréacteur (b) plus conventionnel pour les cultures de racines chevelues où le milieu est vaporisé sur le lit de racines produit une moyenne de 88 spores de *Glomus intraradices* • $\text{g}^{-1}_{\text{humides}}$ • j^{-1} pour 68 jours de cultures de racines de *Daucus Carota*. Le bioréacteur illustré en c est une adaptation des cultures de racines submergées. Finalement le bioréacteur suivant (d) est une modification du précédent. Les racines sont sur un grillage d'acier placé à la surface du liquide plutôt que submergé. Cette position des racines permet un meilleur transfert d'oxygène.

Il ressort de ces trois études que le bioréacteur de type b) avec vaporisation du milieu de culture présente les meilleurs résultats de production moyenne de spores (88 spores • $\text{g}^{-1}_{\text{humide}}$ • j^{-1} comparativement à 37 spores • $\text{g}^{-1}_{\text{humide}}$ • j^{-1} pour le bioréacteur avec un milieu solide et un grillage d'acier). Les deux autres bioréacteurs n'ont permis que de très faibles productions de spores. Les travaux de Chavarie *et al.* (1993), le brevet de Fortin *et al.* (1993) et de Jolicoeur *et al.* (1993) ne comprennent pas les productions vésiculaires qui sont des propagules aussi efficaces que les spores (section 2.2.1.4).

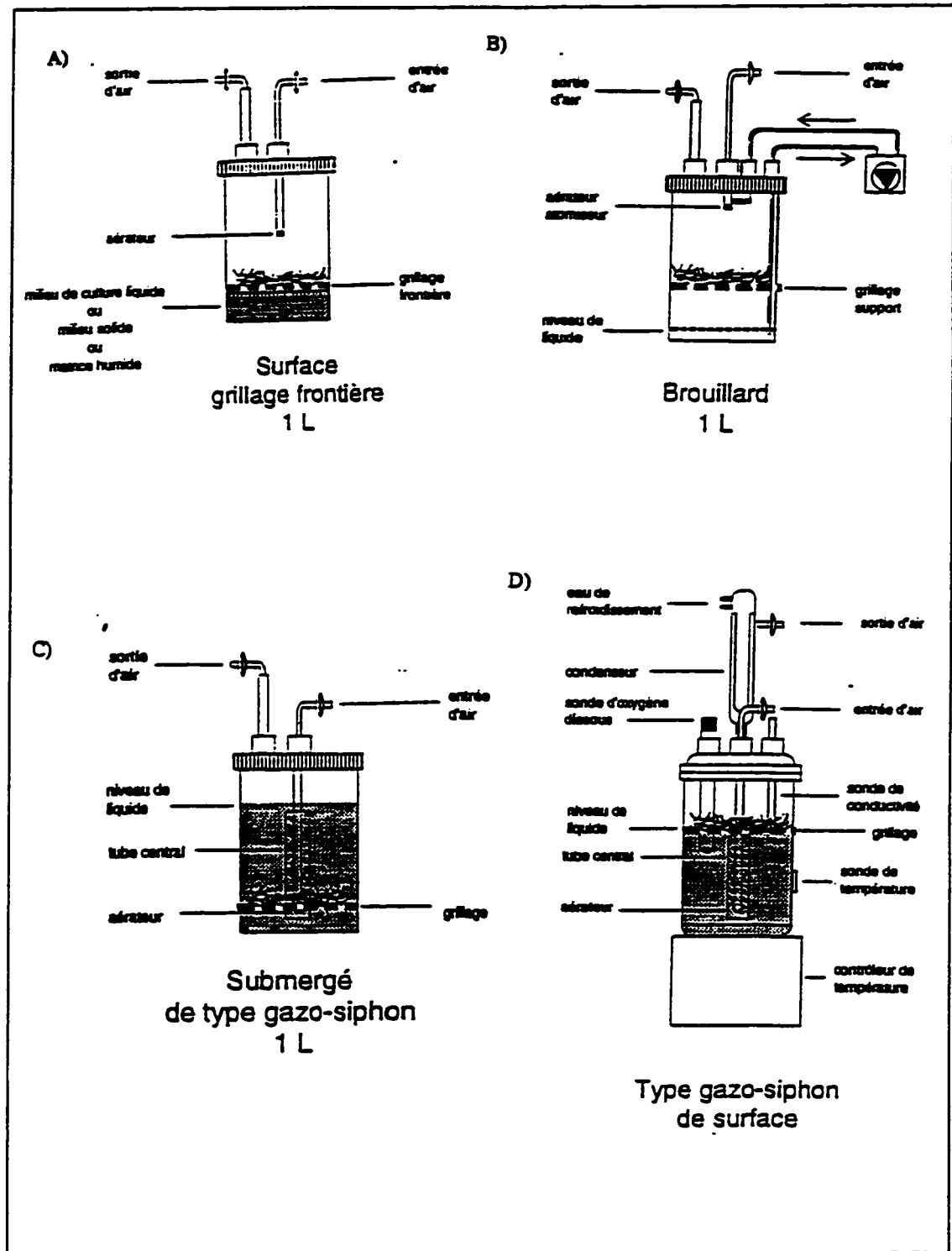


FIGURE 2.6 BIORÉACTEURS TYPES DE L'ÉTUDE DE FAISABILITÉ

D'autres configurations moins conventionnelles de bioréacteurs ont été proposées par Jolicoeur *et al.* (1993) (Figure 2.7). Le premier bioréacteur (a) est une adaptation de celui avec un grillage frontière de la figure précédente, puisque certaines particules de garnissages placées dans le bioréacteur ont des parois en acier inoxydable afin de limiter l'accès des racines au milieu gélifié placé à l'intérieur. Cette configuration permet également l'utilisation de différents milieux de culture à l'intérieur des particules. La seconde configuration (b) implique l'utilisation d'un milieu de culture liquide. Celui-ci est placé dans des tubes distincts, ce qui permet également d'utiliser différents milieux de culture. Une grille est placée à la surface des tubes afin de supporter les racines.

Le système proposé en a) donne de bons rendements de production de spores. Sa production moyenne de spores était de $664 \text{ spores de } Glomus \text{ intraradices} \bullet \text{ g}^{-1}_{\text{humide}} \bullet \text{ j}^{-1}$ pour 61 jours de cultures de racines de *Trifolium pratense* inoculées. Cependant, cette configuration est difficilement réalisable à l'échelle industrielle. Une autre configuration a été proposée dans le rapport de Jolicoeur *et al.* (1993). Ce système (bioréacteur c de la Figure 2.8) est une adaptation du bioréacteur a). Il possède plusieurs plateaux de culture, chacun d'eux représentant un des bioréacteurs de 1 L étudiés et le gel serait pompé à l'intérieur de tubes faits d'un fin grillage. Ce système n'est qu'une ébauche et n'a jamais été réalisé.

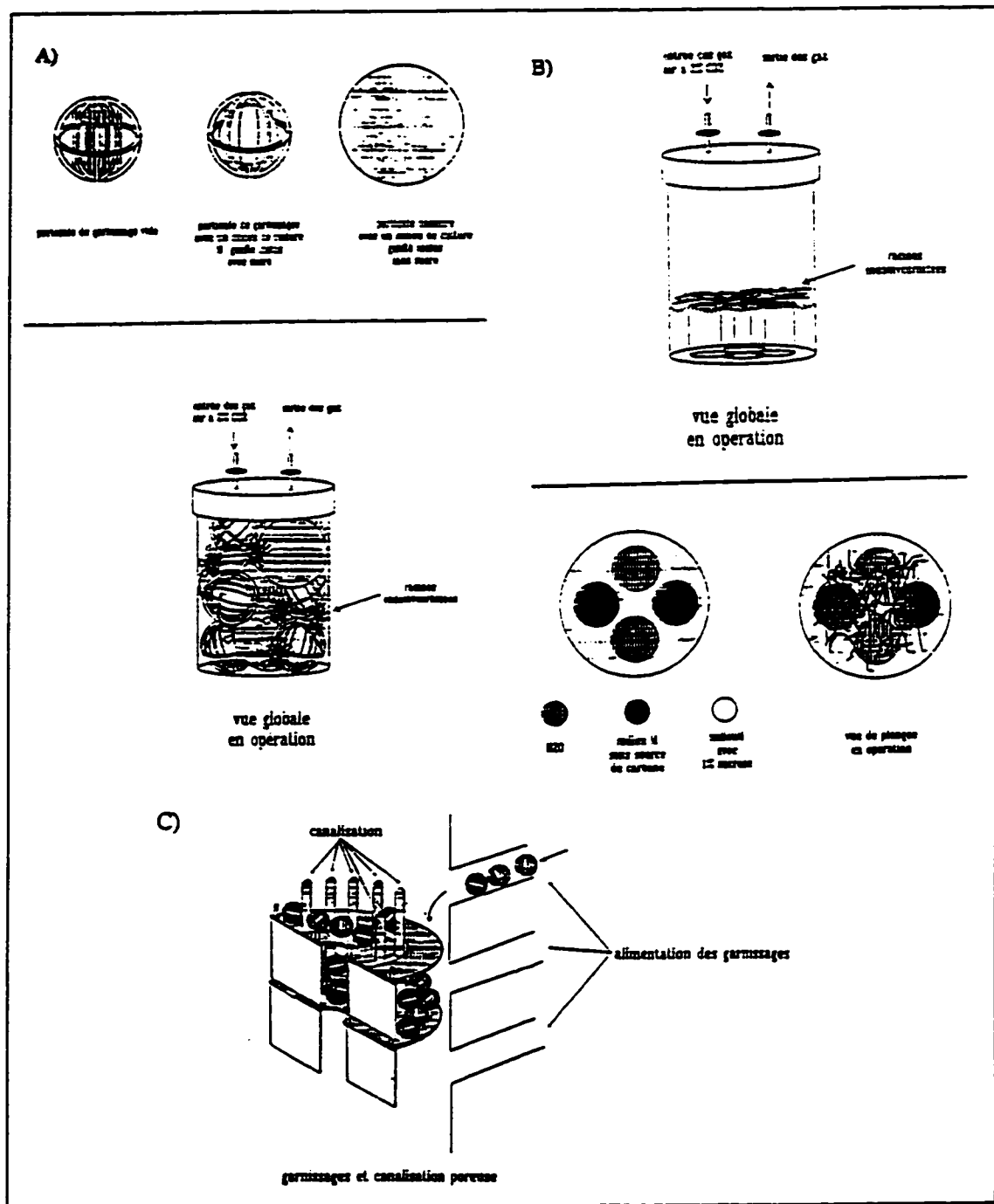


FIGURE 2.7 BIORÉACTEURS DÉVELOPPÉS PAR LE CENTRE DE R&D BIOPRO

Cette revue montre que les champignons endomycorhiziens à arbuscules et vésicules permettent d'augmenter les rendements de production de plusieurs espèces de plantes (augmentation de croissance de 171%, Abbott et Robson, 1977, section 2.2.2). Cependant le taux de colonisation des racines des plantes par ces M.A. peut varier selon les conditions du milieu et les espèces visées (section 2.2.3 et 2.3.1). Il est donc important de contrôler les concentrations de phosphore, d'azote, de sucre et de sulfate de sodium, puisque des concentrations élevées de ces composés sont néfastes au développement du champignon.

Cette revue mentionne également que la culture de racines chevelues transformées et mycorhizées permet de ne pas cultiver toute la plante afin de produire des champignons mycorhizés. Plusieurs configurations de bioréacteurs sont utilisées pour le développement des racines chevelues transformées (section 2.4.2). Cependant, peu de bioréacteurs de production de champignons M.A. ont été développés, dont ceux par les chercheurs de BIOPRO.

Aucunes des productions des bioréacteurs étudiés par ce groupe de recherche ne tient compte des vésicules. Il est donc primordial d'approfondir les recherches des configurations de bioréacteurs qui ont permis d'obtenir les meilleures productions. Le bioréacteur avec un milieu solide et une frontière a permis pour la première fois de déceler des productions importantes de vésicules tout en produisant une grande

quantité de spores ($37\text{--}88 \text{ spores} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{humide}} \cdot \text{j}^{-1}$ pour des temps de culture respectifs de 68 et 81 jours). Ce bioréacteur sera étudié plus à fond dans ce projet.

3.0 OBJECTIFS DE CE PROJET DE RECHERCHE

Les endomycorhizes sont des biofertilisants efficaces pour une grande variété de plantes. Le potentiel économique et écologique de ce produit étant important, Premier Tech Inc. a donc commencé à produire et à vendre des champignons endomycorhiziens. Cependant, les cultures de production d'endomycorhizes se font présentement dans des systèmes qui demandent un temps de culture très long et une main d'oeuvre importante puisqu'elles sont réalisées sur plantes entières dans des serres.

Une étude de faisabilité dirigée par Chavarie *et al.* (1993) a montré qu'il est possible et rentable de produire ces champignons en bioréacteurs. Entre 1993 et 1996, le Centre de R&D BIOPRO a poursuivi des études de production d'endomycorhizes en bioréacteurs. Ces procédés n'ont toutefois pas été étudiés en profondeur afin de permettre une production maximale de champignons endomycorhiziens.

Les configurations de bioréacteurs étudiées par BIOPRO qui permettent d'obtenir les meilleures productions de spores possèdent une barrière physique entre les racines et le milieu de culture. Plus précisément les cultures du bioréacteur avec milieu solide et une feuille de papier comme frontière permettent d'obtenir une production moyenne de

268 spores de *Glomus intraradices* • $\text{g}^{-1}_{\text{humide}}$ • j^{-1} pour 112 jours de culture de racines de *Daucus Carota* inoculées. Cette production dépasse celles obtenues par les configurations brouillard et milieu solide avec un grillage d'acier (Brouillard : 88 spores • $\text{g}^{-1}_{\text{humide}}$ de racine • j^{-1} pour 81 jours de culture; solide : 37 spores • $\text{g}^{-1}_{\text{humide}}$ de racine • j^{-1} pour 68 jours de culture). Le nombre de vésicules n'a cependant pas été évalué et le suivi des nutriments comme le phosphore, les sucres et le nitrate n'a pas été réalisé.

L'objectif principal de ce présent projet de recherche était donc de cerner davantage les performances du bioréacteur gel-papier afin d'en maximiser la production pour ultimement développer un système de production industriel de champignons endomycorhiziens à arbuscules et vésicules.

Afin de répondre à cet objectif plusieurs défis ont été relevés:

1-différentes barrières physiques ont été étudiées afin de limiter l'accès des racines au milieu de culture.

2- des essais sur le pompage du gel à l'intérieur du bioréacteur ont été réalisés.

3- des cultures ont été faites avec d'autres supports de culture que le gel afin de simplifier les opérations.

4- les éléments nutritifs du milieu de culture ont été suivis et ont permis d'établir leur consommation.

5- les effets de ces nutriments sur la production de champignons M.A. ont été évalués.

6- la production des vésicules et des spores a été analysée et comparée au taux de respiration de la biomasse afin de relier la prolifération du champignon au taux de production de CO_2 (CPR).

4.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1 SYMBIOTES UTILISÉS POUR LES CULTURES

Premier Tech Inc., le commanditaire des travaux de recherche de BIOPRO dans ce domaine, produit des champignons endomycorhiziens en pots. Le champignon utilisé est le *Glomus intraradices* provenant d'une souche de Pont-Rouge au Québec. Cette entreprise cultive ce champignon pour sa compatibilité avec un grand nombre d'espèces de plantes généralement cultivées en Amérique du Nord. Toutes les études de cette recherche ont été réalisées avec des racines transformées de *Daucus carota* L, mycorhizées avec le champignon *Glomus intraradices* de cette souche.

4.2 CULTURES EN BIORÉACTEURS

4.2.1 PRÉPARATION DES INOCULA

Des racines de *Daucus carota* chevelues transformées par *Agrobacterium rhizogenes* non-mycorhizées sont cultivées dans des flacons agités au moyen d'un milieu

White modifié (Tableau 2.2). Ces racines sont ensuite placées dans des boîtes de Pétri contenant du milieu M (Bécard et Fortin, 1988, Tableau 2.2) liquide et un carré de gel contenant des spores de *Glomus intraradices*. Après 3 à 4 mois de culture dans un incubateur à 26°C ces racines mycorhizées sont prêtes à être utilisées.

Deux grammes de racines coupées à l'aide d'un scalpel en section de 2 à 4 cm, afin de simuler une inoculation industrielle qui provoquerait inévitablement un bris des racines, forment l'inoculum de chacun des bioréacteurs.

4.2.2 MILIEU DE CULTURE

Les cultures de racines transformées et mycorhizées réalisées ont été faites au moyen de milieu M gélifié avec du gellan. Les gellans sont des polysaccharides anioniques produits par la bactérie *Pseudomonas elodea* (Doner et Douds., 1995). Ces derniers sont préférés aux agars parce qu'ils sont transparents et qu'ils offrent une meilleure rigidité pour une même concentration. Il est important de souligner que la plupart des gellans vendus sur le marché contiennent des impuretés. Les gellans purifiés sont très coûteux et ne sont utilisés qu'en recherche. Le Tableau 4.1 indique les concentrations des principaux nutriments ajoutés par les impuretés principales du Gelgro^{MC}, le gellans utilisé dans cette étude.

TABLEAU 4.1 PRINCIPALES IMPURETÉS INORGANQUES DU GELGRO^{MC}

Éléments	Gelgro ^{MC} (mmol • L ⁻¹)
PO ₄	0,07
Ca	0,5
Na	0,75
K	1

Le milieu développé par Bécard et Fortin (1988) (Tableau 2.2) est adéquat à la croissance des racines et du champignon. Ce milieu sera donc utilisé pour les cultures en bioréacteur. Pour gélifier ce milieu du Gel-Gro à 0,4% (g • L⁻¹) est utilisé.

Certaines configurations de bioréacteur étudiées ont été expérimentées au moyen de milieu liquide. Celui-ci doit alors être modifié pour tenir compte de l'apport en phosphate du gellan. Une étude de Doner et Douds (1995) montre en effet que le PO₄ provenant du gel augmente la colonisation des racines de 50%. La concentration en PO₄ est donc augmentée de 0,04 mM à 0,12 mM.

4.2.3 DESCRIPTION DES BIORÉACTEURS

L'enceinte des bioréacteurs (Figure 4.1) est un contenant de 1,3 L en polyméthylpentène, un polymère stérilisable et transparent, qui permet d'effectuer un suivi visuel des cultures. Des filtres ("Bacterial air vent", Gelman Sciences) stérilisables de $0,3\ \mu\text{m}$ sont placés sur le couvercle afin de permettre une aération.

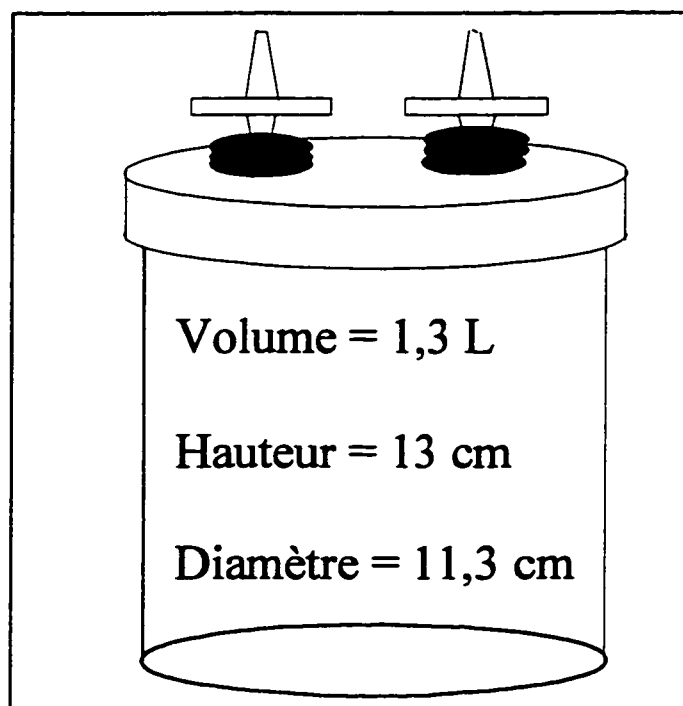


FIGURE 4.1 BIORÉACTEUR TYPE

4.2.3.1 Bioréacteur tubulaire

Une modification a été apportée à cette enceinte pour une production semi-continue de spores. Le gel, préalablement concassé à l'aide d'une spatule en acier inoxydable stérile, est déposé dans un récipient stérile pour être ensuite acheminé au bioréacteur (Figure 4.2) à l'aide d'une pompe péristaltique à débit réglable. Chacun des 5 tubes en acier inoxydable (maillages de 0,16 mm) est rempli de 50 mL de milieu M gelifié.

Afin de préserver la stérilité du bioréacteur les tubes extérieurs de l'enceinte sont faits de silicone. Il faut noter que chaque tube doit demeurer stérile avant et après le pompage du gel. Pour ce faire des bouchons en coton sont placés à l'embouchure des tubes de silicone avant la stérilisation. Après le pompage du gel des bouchons de caoutchouc stérilisés séparément sont placés à la sortie des tubes pour empêcher toute pénétration d'un contaminant. Les racines chevelues transformées et mychorisées sont finalement déposées sur la surface externe des tubes.

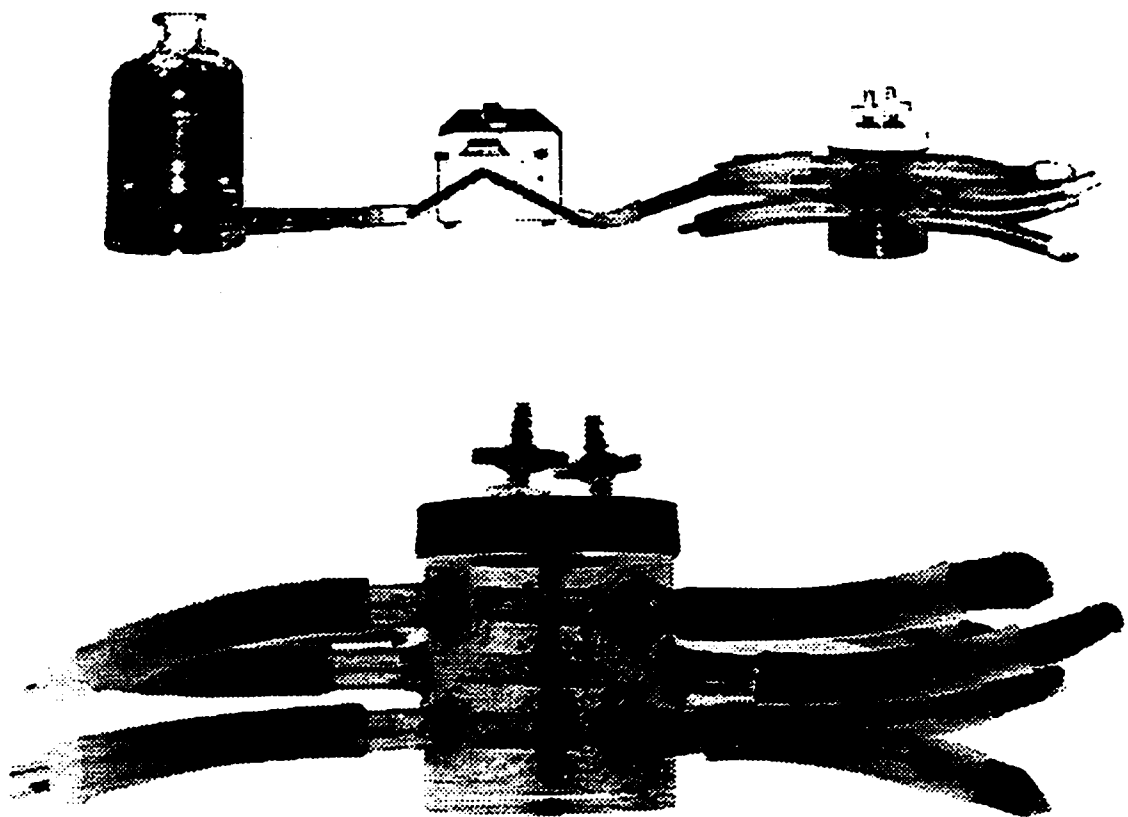


FIGURE 4.2 SCHÉMA DU BIORÉACTEUR TUBULAIRE

4.2.3.2 Bioréacteur gel-papier avec encavures

Le stress imposé aux racines par une limitation d'accès à leur milieu de culture est la voie privilégiée pour obtenir une bonne production de propagules. Différents types de barrières physiques ont été utilisées afin de provoquer ce stress.

Des cultures ont été effectuées avec une feuille de papier (filtre Wattman #4) comme frontière entre les racines et le milieu de culture. Ce bioréacteur (Figure 4.3) comporte des encavures dans le gel afin d'augmenter de 80% la surface de contact avec le milieu de culture.

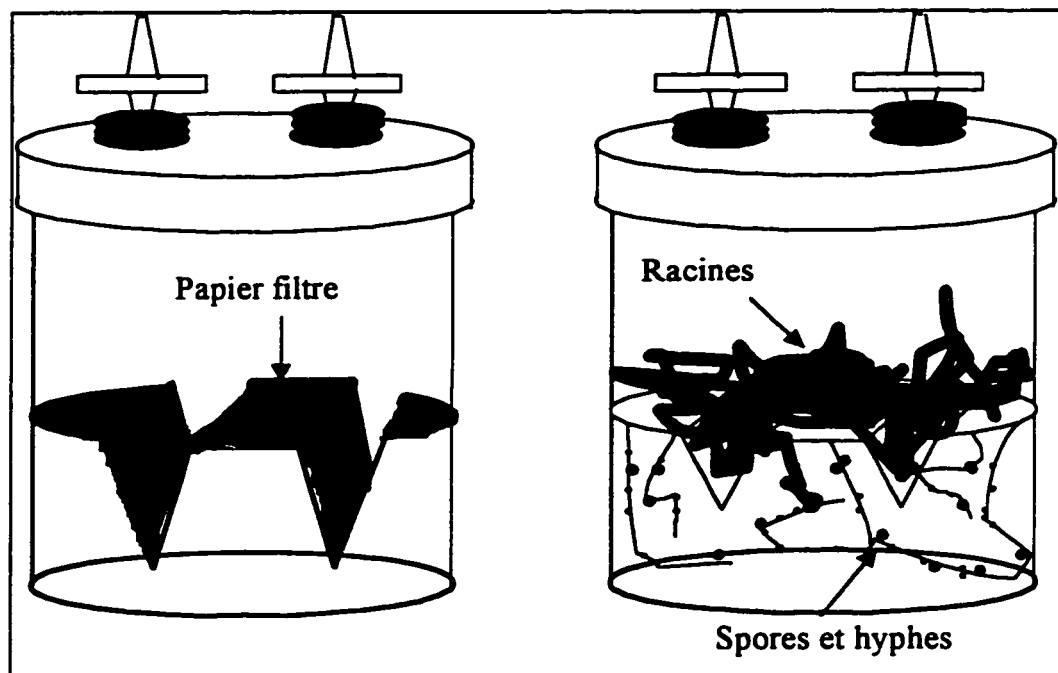


FIGURE 4.3 BIORÉACTEUR AVEC ENCAVURES

Pour que ces encavures soient identiques dans tous les bioréacteurs, un grillage d'acier (maillages 2 mm) est placé à l'intérieur de chacun d'eux. Ce moule demeure dans le bioréacteur durant toute la culture. Il y a 250 mL de milieu nutritif après la coupe du gel. Par la suite, la feuille de cellulose est déposée sur le gel et finalement l'inoculum est déposé de façon aléatoire sur la feuille de papier.

4.2.3.3 Bioréacteur avec Perlite^{MC}

La Perlite^{MC} est un des supports de culture qui a été utilisé pour remplacer le gel. La Perlite^{MC} est très utilisée en horticulture puisqu'elle permet une meilleure aération du sol. Ce support horticole est un silicate d'aluminium amorphe et métastable. Ses principales caractéristiques physiques ainsi que sa composition chimique sont présentées aux Tableaux 4.2 et 4.3 (Uluatam, 1991).

TABLEAU 4.2 PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE LA PERLITE^{MC}

Paramètres		Paramètres	
Couleur	Gris, blanc, noire	Chaleur spécifique	0,84 kJ • kg ⁻¹ • °C
Point de fusion	1315-1390°C	Humidité libre	0,5%

TABLEAU 4.3 COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PERLITE^{MC}

Perlite^{MC}	% (g • g⁻¹)	Perlite^{MC}	% (g • g⁻¹)
SiO ₂	71-75	TiO ₂	0,03-0,2
Al ₂ O ₃	12,5-18	MnO ₂	0-0,1
Na ₂ O	2,9-4	SO ₃	0-0,1
K ₂ O	4-5	FeO	0-0,1
CaO	0,5-0,2	Ba	0-0,1
Fe ₂ O ₃	0,1-1,5	PbO	0-0,5
MgO	0,03-0,5	Cr	0-0,1

Avant la stérilisation, la Perlite^{MC} est lavée avec de l'eau distillée (10 L • kg⁻¹ de Perlite^{MC}) puis trempée dans de l'eau déminéralisée (5 L • kg⁻¹ de Perlite^{MC}) pendant deux cycles de 24 heures afin d'enlever tout résidu qui pourrait affecter la croissance des racines et la production du champignon. Ce support solide est passé dans un tamis (maillages de 2,5 mm) pour obtenir des grains de taille uniforme. Il est finalement séché pendant 24 heures dans un four à 90°C avant d'être placé dans les contenants de 1,3 L pour être stérilisé pendant 60 minutes.

Chaque bioréacteur contient 25 g de Perlite^{MC} sec et 175 mL de milieu liquide M enrichi 3 fois en phosphate. L'inoculum est déposé de façon aléatoire sur le lit de Perlite^{MC}.

4.3 ÉCHANTILLONAGE

Il est impossible de prendre des échantillons représentatifs de racines, de gel ou de liquide sans arrêter la culture afin de récolter l'ensemble du bioréacteur. Donc, pour faire un suivi d'une culture une série de bioréacteurs sont démarrés simultanément. Ces bioréacteurs de mêmes caractéristiques ont des compartiments très similaires et sont récoltés à des périodes fixes dans le temps. Il est ainsi possible de faire un suivi d'une culture dans le temps avec au moins deux points de comparaison par récolte.

4.4 MÉTHODES ANALYTIQUES

4.4.1 MESURE ET ÉVALUATION DU CO₂ PRODUIT

4.4.1.1 Mesure du CO₂

Durant les cultures, une mesure périodique (1 fois semaines) de la composition du CO₂ de la phase gazeuse des bioréacteur était faite.

La concentration de CO_2 présente dans la phase gazeuse du bioréacteur est lue en boucle fermée à l'aide d'un analyseur de CO_2 (Rosemount Analytical, Model 870, "Infrared Analyzer") (Figure 4.4). Pour faire cette mesure une partie des gaz de la tête du bioréacteur est pompée depuis l'un des filtres à l'extérieur du bioréacteur. Ce gaz passe par la chambre à infrarouge et est retourné au bioréacteur par l'autre filtre.

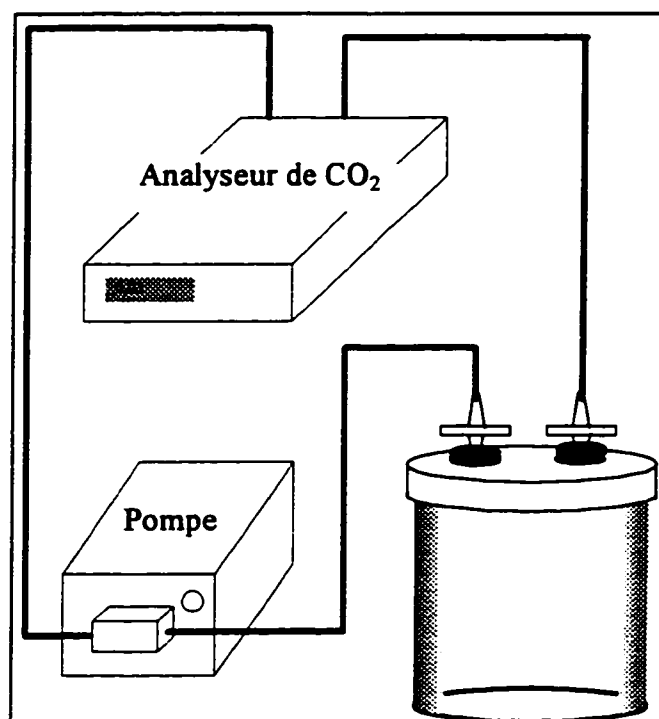


FIGURE 4.4 SCHÉMA DU MONTAGE POUR LA MESURE DE CO_2

4.4.1.2 Évaluation de la production de CO₂ par la biomasse

La variation de la concentration de CO₂ présent dans la phase gazeuse du bioréacteur ne correspond pas à la production complète de CO₂ par la biomasse puisque du CO₂ est libéré au travers des filtres du bioréacteur. Le calcul du taux de production de CO₂ par la biomasse (CPR) doit donc tenir compte de cette perte de CO₂.

Un taux de perte a donc été estimé par des essais sur un système modèle. Ce système est un bioréacteur standard (Figure 4.1) contenant de la Perlite^{MC} lavée et tamisée afin de simuler la présence de gel, de liquide ou d'autres particules solides. Du CO₂ a ensuite été injecté à l'intérieur du bioréacteur et celui-ci a été placé en boucle fermée (Figure 4.4) afin de mesurer la concentration de CO₂ présente. Finalement un suivi, dans le temps, de la concentration résiduelle de CO₂ à l'intérieur du bioréacteur a été fait (Figure 4.6). Il faut noter que toutes les mesures de CO₂ ont été corrigées afin de tenir compte de la dilution de 20 % occasionnée par la tuyauterie.

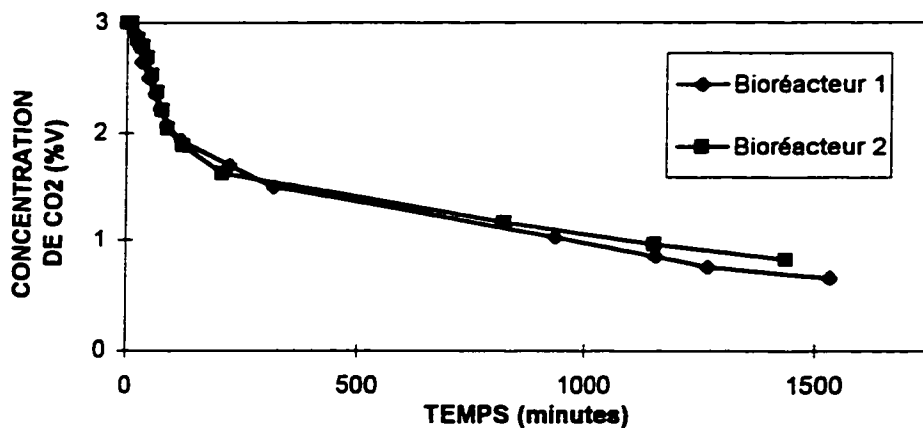


FIGURE 4.5 SUIVI DU CO₂ PERDU PAR LES FILTRES

La variation du dioxyde de carbone à l'intérieur des bioréacteurs, enregistrée lors de ces expériences, permet d'estimer le taux de perte par les filtres. En effet, il est connu que la variation d'une concentration dans le temps peut être exprimée par la relation suivante:

$$dCO_2 \cdot (dt)^{-1} = K_{La} \cdot (CO_2^* - CO_2) \quad (4.1)$$

Le CO_2^* est la concentration de dioxyde de carbone à l'équilibre avec son environnement. Dans le cas présent le gaz du bioréacteur est à l'équilibre avec de l'air. Le CO_2^* représente 0,03% du contenu moyen de l'air. Le K_{La} est un coefficient qui donne une indication de la vitesse à laquelle le transfert des gaz se fait. Dans les bioréacteurs ce n'est pas un coefficient de transfert mais un coefficient de perte. Il sera plutôt noté par K_{pa} .

Il est donc possible de déterminer $K_p a$ en trouvant la pente du logarithme naturel de la concentration de CO_2 lue en fonction du temps, car l'intégration de l'équation de la variation de la concentration dans le temps donne la droite suivante:

$$\ln (\text{CO}_2 - \text{CO}_2^*) = -K_p a \cdot t + \text{cst.} \quad (4.2)$$

Deux essais ont été réalisés avec des filtres différents pour s'assurer que le coefficient de perte pouvait être utilisé pour l'ensemble des cultures (Figure 4.6). Le coefficient de perte est semblable pour ces deux expériences, l'écart ne dépassant pas 10%.

Le coefficient de perte est de $0,048 \text{ h}^{-1}$ pour les concentrations inférieures à 2% avec un coefficient de régression linéaire r^2 de 0,99. La Figure 4.7 compare une des courbes mesurées à celles estimées avec ce coefficient de perte.

Par la suite, pour calculer le taux de production de CO_2 (CPR), il est possible de modifier l'équation 4.1 donnant la variation de CO_2 dans le temps afin d'obtenir l'équation suivante:

$$\begin{aligned} \text{CPR} = d\text{CO}_2 \cdot (dt)^{-1} &= (\text{CO}_{2(t)} - \text{CO}_{2(t-1)}) \cdot (t_{(t)} - t_{(t-1)})^{-1} + \\ &K_p a \cdot ((\text{CO}_{2(t)} + \text{CO}_{2(t-1)}) \cdot (2)^{-1} - \text{CO}_2^*) \end{aligned} \quad (4.3)$$

Cette production représente la respiration de la biomasse qui est principalement racinaire. Il est intéressant de calculer le taux spécifique de production de CO_2 (Q_{CO_2}) en fonction de la biomasse présente et du taux de production de CO_2 (CPR).

$$Q_{\text{CO}_2} = \text{CPR} \cdot x^{-1} \quad (4.4)$$

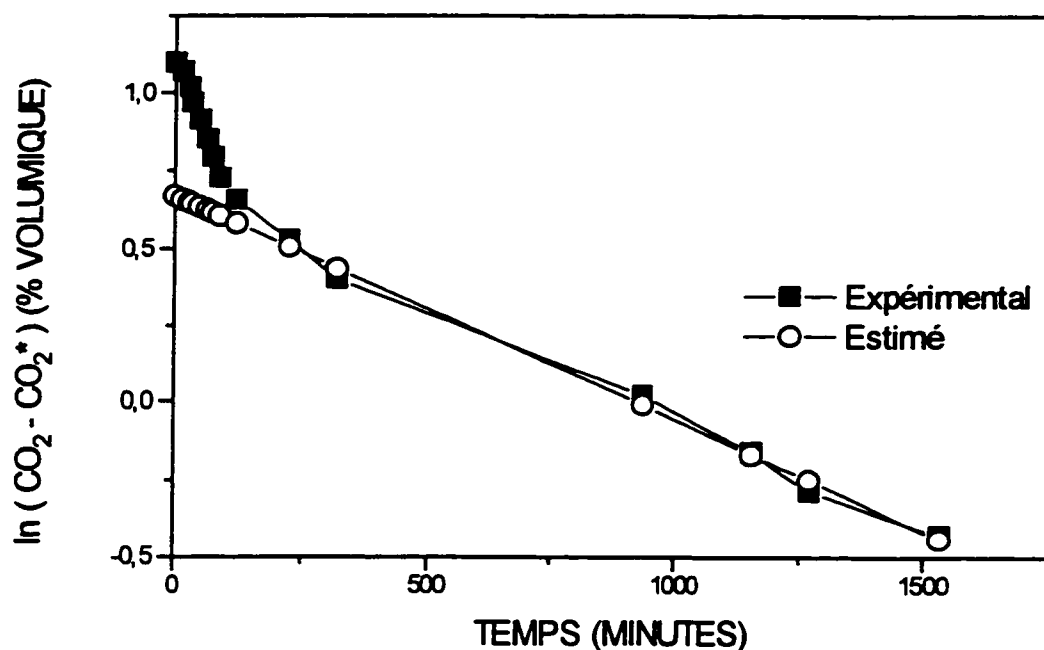


FIGURE 4.6 COMPARAISON DES DONNÉES ESTIMÉES AVEC LES DONNÉES EXPÉRIMENTALES

4.4.2 MESURE DE LA BIOMASSE, DU pH, DE LA CONDUCTIVITÉ, DES IONS ET DES HYDRATES DE CARBONE

Pour chaque récolte de bioréacteurs, les poids humide et sec des racines produites étaient mesurés. Pour obtenir le poids sec, les racines sont placées dans une étuve à 80°C pendant 24 heures. Ce poids sec est utilisé pour tous les calculs impliquant la biomasse.

Le milieu de culture gélifié était filtré sous pression pour en briser les liens ioniques afin d'obtenir des échantillons liquides. Pour ce faire, le gel était filtré dans des seringues de 15 mL contenant des billes de verres de 1 mm de diamètre. Ces billes permettent de briser le gel. Une pièce de polyester (matériel 7607 de Texel, Inc., Ste. Marie de Beauce, Québec, Canada) était placée avant la sortie de la seringue afin de filtrer le gel. Le pH ainsi que la conductivité des échantillons liquides étaient ensuite mesurés. Ces échantillons étaient finalement refiltrés à 0,45 µm (Nylaflo^{MC}, Gelman Science) et congelés (-20°C) pour leur analyse subséquente.

4.4.2.1 Hydrates de carbone

La concentration du milieu de culture en sucrose, glucose et fructose était mesurée au moyen d'un chromatographe en phase liquide haute performance (HPLC) comportant une pompe Waters modèle 6000A, un injecteur automatique Gilson modèle 231/401,

un réfractomètre (modèle 132, Gilson), un élément chauffant (modèle 7980, Mantech) et un intégrateur (HP3394A, Hewlett-Packard). La séparation des hydrates de carbone était assurée par une colonne Biorad^{MC} HPX87C maintenue à 80 °C. Le volume des injections était de 20 µL alors que la phase mobile était de l'eau pure alimentée à 1 mL • min⁻¹.

4.4.2.2. Chromatographie ionique

Les concentrations résiduelles des anions et des cations étaient analysées par chromatographie ionique. Le système de chromatographie était composé d'une pompe, d'un injecteur automatique et d'un détecteur électrochimique opéré en mode conductivité (Dionex). Ce système était contrôlé par le logiciel Dionex AI-450.

Les anions étaient séparés par une colonne 4 x 250 mm IONPAC AS4A-SC (Dionex) et un supresseur anionique (Dionex, ASRS-1). La phase mobile était une solution tampon aqueuse de bicarbonate (1,8 mM Na₂CO₃ et 1,7 mM NaHCO₃) alimentée à un débit 2,0 mL • min⁻¹.

Les cations étaient séparés par une colonne 4 x 250 mm IONPAC CS-12 (Dionex) et un supresseur cationique (Dionex, CSRS-1). La phase mobile était une solution aqueuse d'acide méthanosulphonique (20 mM) alimentée à un débit de 1.0 mL • min⁻¹.

4.5 MESURE DE LA PRODUCTION DE PROPAGULES

4.5.1 MESURE DE LA QUANTITÉ DE VÉSICULES INTRARACINAIRES

Pour mesurer la quantité de vésicules intraracinaires leur coloration au Chlorazol Black est faite selon la méthode de Brundrett, Piché et Peterson (1984). Une modification de la méthode d'intersection développée par Brundrett *et al.* (1994) est utilisée afin d'estimer le nombre de vésicules intraracinaires. Celle-ci consiste à diviser les racines en sections de 2 mm et à compter le nombre de vésicules présentes dans chacune d'elles et à évaluer le pourcentage de ces sections qui contiennent au moins une vésicule.

Pour évaluer le nombre total de propagules produites par une culture, il faut estimer le nombre total de vésicules intraracinaires des racines. Cependant cette estimation exige la mesure de la longueur des racines récoltées. Celle-ci étant très difficile à faire, des échantillons représentatifs de racines ont été récoltés de différents bioréacteurs. Leur longueur a été mesurée en fonction de leur poids sec. La longueur moyenne mesurée correspondant à un gramme de racines sèches est de 104 mètres. Le nombre

de vésicules est donc estimé de la façon suivante:

$$\begin{aligned} \# \text{ de vésicules} &= \text{Poids sec des racines (g)} \bullet 104 \text{ (m} \bullet \text{g}^{-1}) \bullet \% \text{ de sections des} \quad (4.5) \\ \text{racines contenant une vésicule} &\bullet \# \text{ de vésicules par mm} \bullet 1000 \text{ (mm} \bullet \text{m}^{-1}) \end{aligned}$$

4.5.2 MESURE DE LA QUANTITÉ ET DE LA VIABILITÉ DES SPORES

Une méthode de comptage des spores a été développée par le Dr. Robert D. Williams de l'équipe de recherche. Cette méthode permet d'évaluer avec une erreur de 10 à 20% la quantité de spores présentes dans le gel. Cette méthode (Figure 4.8) consiste à récolter le milieu gélifié contenant les spores et à le placer dans un mélangeur (a) avec de l'eau. Le rapport eau-gel dépend de la dilution de spores souhaitée. Il faut au minimum un poids égal d'eau et de gel afin d'obtenir un mélange homogène. Une agitation de 30 secondes à une rotation faible permet de briser les liens qui forment le gel et d'obtenir une distribution uniforme des spores. Un échantillon de 15 mL est pipeté et placé dans un Pétri (b) qui est déposé sur une plaque de comptage. Cette plaque est divisée de telle façon que six carreaux représentent 20% de la plaque (c). Chacun des carreaux est divisé en 6 pour permettre un comptage plus précis. Le compte des spores se fait ensuite à l'aide d'un binoculaire (d).

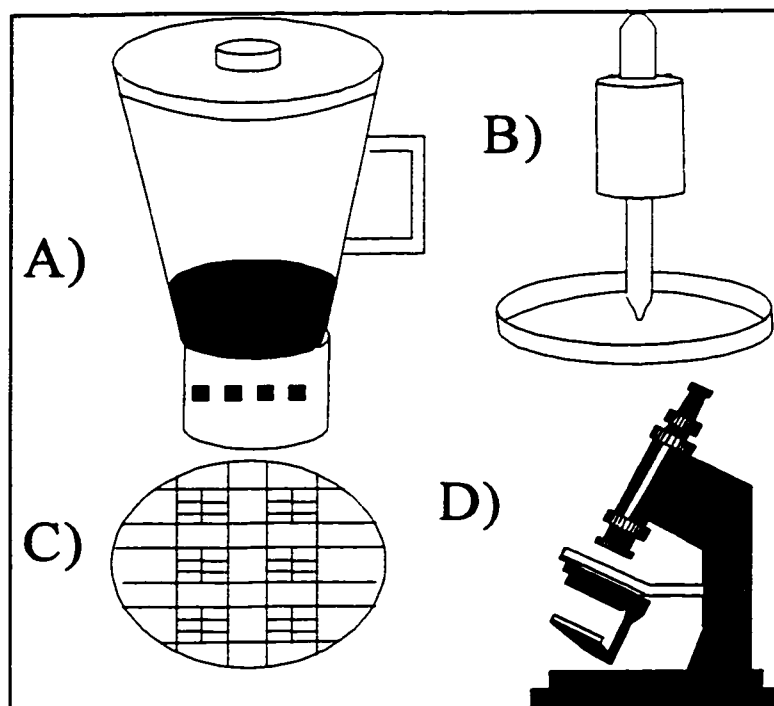


FIGURE 4.7 MÉTHODE DE COMPTAGE DES SPORES

La quantification, à l'aide de cette méthode, des spores produites à l'intérieur d'une matrice solide comme la Perlite^{MC} est impossible. Par ailleurs, il est possible d'évaluer la production de spores à l'intérieur ou sur les parois de la Perlite^{MC} au moyen de leur pouvoir germinatif. Les particules de Perlite^{MC} récoltées stérilement des bioréacteurs sont déposées sur un milieu gélosé dans des conditions favorables de culture (26°C et 2% CO₂). S'il y a présence d'une propagule viable, il y aura germination puisque des essais en boîtes de Pétri montrent des pourcentages de germination de près de 90% des spores récoltées de bioréacteurs statiques. Cette méthode permet d'évaluer le nombre de grains de Perlite^{MC} qui contiennent au moins une spore viable.

Cependant, les plus gros grains de Perlite^{MC} récoltés peuvent contenir une grande quantité de spores. Cette méthode sous-estime donc très probablement la production réelle de spores. Afin de contourner cette difficulté, cette méthode simple a été améliorée en broyant, à l'aide d'une spatule en acier inoxydable, et en tamisant aseptiquement au moyen d'une série de tamis d'ouvertures décroissantes, (2,5 mm; 1,7 mm; 1,18 mm et 0,595 mm) les grains récoltés. Les particules de chacune de ces fractions sont ensuite placées sur du milieu gélosé approprié. L'apparition d'hyphes provenant des particules indique le nombre de grains qui contiennent au moins une spore viable. Cette procédure, plutôt brutale, occasionne sûrement la destruction partielle d'une certaine quantité de spores. Cependant, elle permet une évaluation plus réaliste de la production obtenue. La Figure 4.9 illustre la variation du nombre de tubes germinatifs obtenus en fonction du degré de fractionnement des grains récoltés. Ce fractionnement des grains permet de multiplier le nombre de spores récoltées totales par un facteur de 100.

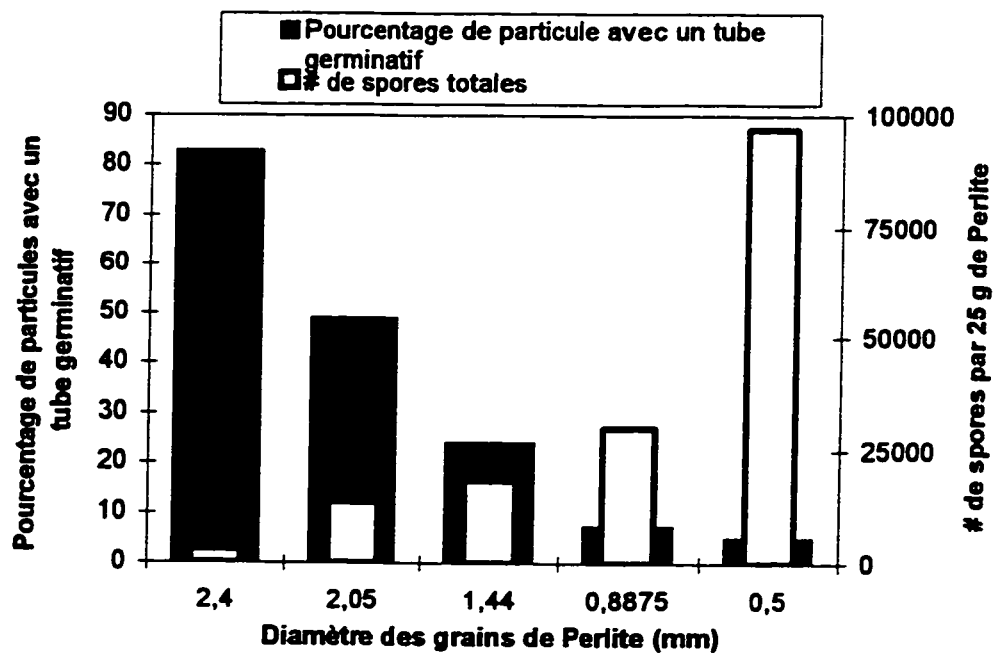


FIGURE 4.8 NOMBRE DE PROPAGULES EN FONCTION DU DIAMÈTRE DES GRAINS DE PERLITE^{MC} FRACTIONNÉS

Des tests de viabilité des spores produites au moyen des bioréacteurs gel/papier ont également été réalisés. Le gel contenant les spores a été dissous à l'aide d'un tampon citrate selon la méthode de Doner et Bécard (1991). Les spores ainsi récoltées ont été placées sur des milieux gélosés adéquats. Le pourcentage de spores germées est de 90%.

4.5.3 MESURE DE LA MASSE D'UNE SPORE

Afin de déterminer la masse d'une spore un bioréacteur gel-papier a été récolté. Le gel a été dissous selon la méthode au tampon citrate (Doner et Bécard, 1991). Les spores ont été comptées selon la méthode décrite à la section 4.5.2. et leur poids humide a été mesuré. Les spores ont ensuite été placées dans une étuve à 80°C pendant 24 h. Leur poids a de nouveau été mesuré et divisé par le nombre de spores comptées. Le poids d'une spore de *Glomus intraradices* avec les hyphes qui y sont attachées est de 0,312 µg.

5.0 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette section est divisée en quatre parties. La première est centrée sur l'étude de la configuration gel-papier. Par la suite les connaissances acquises lors de cette étape sont appliquées afin d'élaborer des solutions plus facilement extrapolables à l'échelle industrielle. La deuxième partie est consacrée à ces solutions.

Par la suite une comparaison entre les différentes configurations des bioréacteurs donnant les meilleures productions sera présentée. Finalement des procédés de récolte de ces différents types de bioréacteur seront discutés.

5.1 ÉTUDE DU BIORÉACTEUR GEL-PAPIER

5.1.1 BIORÉACTEUR AVEC ENCAVURES

Une série préliminaire de cultures en bioréacteur a démontré une grande variation de la colonisation racinaire d'un bioréacteur à l'autre (40 à 80%). Des enconvures ont donc été faites dans le gel afin d'augmenter de 80% la surface de contact entre les racines et le milieu de culture et d'uniformiser les cultures en bioréacteur (Figure 4.3).

Les variations des productions de spores pour les cultures avec encavures et celles sans encavures sont semblables. Cependant le pourcentage de colonisation, défini comme le nombre de sections de racines de 2 millimètres qui contiennent au moins une vésicule, est augmenté de 39% avec la présence d'encavures. L'indice de croissance racinaire était supérieur de 45% pour les bioréacteurs avec encavures. Ces résultats montrent que les racines dans une configuration conventionnelle se retrouvent rapidement sur les parois latérale du cylindre et la croissance racinaire ainsi que la mycorhization des nouveaux apex des racines deviennent très difficiles. Les bioréacteurs des essais subséquents ont donc une configuration avec encavures.

5.1.2 PLAN EXPÉRIMENTAL

Deux séries consécutives de bioréacteurs gel-papier avec encavures ont été démarrées (une série de 14 et l'autre de 10 bioréacteurs). Tous les résultats présentés de cette section, provenant des cultures au moyen des bioréacteurs gel-papier, combinent ces deux séries. L'écart noté entre les différents points d'échantillonnage représente l'écart type qu'il y a entre tous les bioréacteurs récoltés pour cette période de culture.

Chacun des bioréacteurs contenait 250 mL de milieu solide et environ 2 grammes de racines humides avec un pourcentage de mycorhization initial entre 1 et 15%. Les

bioréacteurs sont récoltés par paire et leurs temps de culture est fixe. Le Tableau 5.1 résume le temps de culture des deux séries de bioréacteurs.

TABLEAU 5.1 TEMPS DE CULTURE DES BIORÉACTEURS GEL-PAPIER

Première série (semaines)	Deuxième série (semaines)
4	4
6	Pas de bioréacteur récolté
8	8
10	Pas de bioréacteur récolté
12	12
16	16
Pas de bioréacteur récolté	20

5.1.3 PRODUCTION DE PROPAGULES

Cette section présente les résultats des productions obtenues des deux séries de bioréacteurs gel-papier avec encavures. La production des bioréacteurs est la quantité de propagules endomycorhiziennes totales recueillies lors de la récolte. Celles-ci sont composées des spores et des vésicules présentes dans l'ensemble des racines par litre utile d'un bioréacteur.

Il est important de définir ce que représente un litre utile de bioréacteur. À cause des encavures le volume occupé par le milieu de culture est en réalité de 350 mL. En ajoutant à ce volume l'espace occupé par les racines (75 mL), le volume total occupé par une culture est de 425 mL. Il est cependant possible de superposer deux cultures de 425 mL dans un bioréacteur d'un volume physique total de 1,3 L. Le volume utile est donc de 65% du bioréacteur de 1,3 L. Les résultats de chaque culture sont donc multipliés par deux, pour donner la production qu'il serait possible d'atteindre avec un bioréacteur de 1,3 L de volume physique total.

L'équation 5.1 est utilisée pour le calcul du nombre de propagules :

$$\# \text{ Propagules} \bullet L_{\text{utile}}^{-1} = \text{longueur racines sèches (mm)} \bullet \quad (5.1)$$

$$L_{\text{utile}}^{-1} \bullet \% \text{ de mycorhization} \bullet \text{Densité vésiculaire} \bullet \text{mm}^{-1} + \# \text{ de spores} \bullet L_{\text{utile}}^{-1}$$

La Figure 5.1 présente un résumé des résultats des cultures effectuées au moyen du bioréacteur gel-papier avec encavures. La Figure 5.1 (A) présente le profil de production en spores et en vésicules par litre utile de milieu ainsi que le nombre de propagules totales et la croissance de la biomasse sèche. Afin d'évaluer le nombre de vésicules, le pourcentage de colonisation et la densité vésiculaire doivent être connus. La Figure 5.2 présente ces données.

La production maximale de propagules avec ce prototype est d'environ un million par litre utile de bioréacteur ($9,85 \bullet 10^5$ en 112 jours). Cette production ramenée sur une base moyenne par jour et exprimée par gramme de racines humides inoculées par litre utile devient $2200 \text{ propagules} \bullet \text{g rac}_{\text{humide}} \text{ inoculé}^{-1} \bullet \text{j}^{-1}$. La production de spores par litre utile est de $1,85 \bullet 10^5$ en 112 jours ou une production moyenne de $413 \text{ spores} \bullet \text{g rac}_{\text{humide}} \text{ inoculée}^{-1} \bullet \text{j}^{-1}$. Il faut cependant noter que la production de spores plafonne à la 12^{ème} semaine (84 jours). La production moyenne ramenée sur 84 jours devient alors $550 \text{ spores} \bullet \text{g rac}_{\text{humide}} \text{ inoculée}^{-1} \bullet \text{j}^{-1}$.

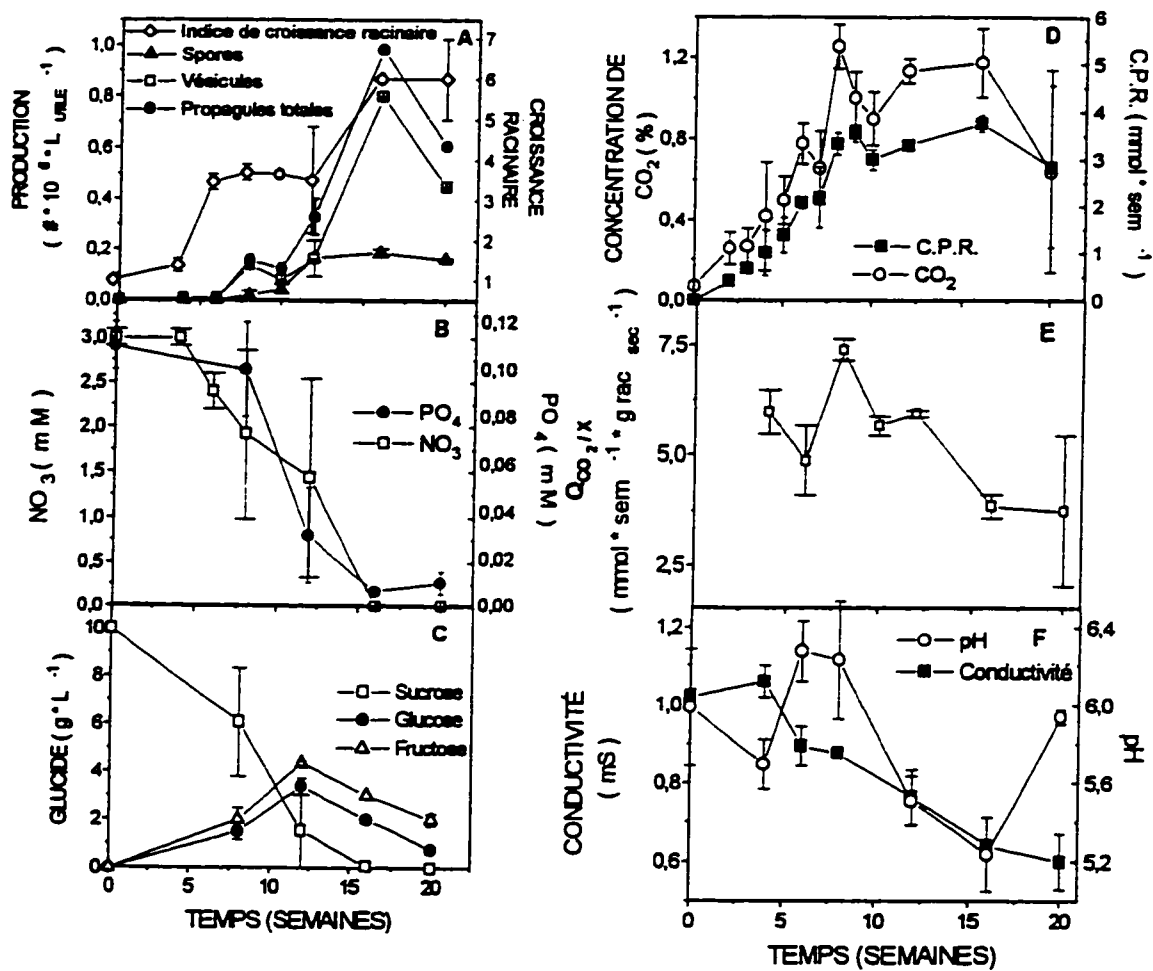


FIGURE 5.1 RÉSULTATS DES CULTURES EN BIORÉACTEURS GEL-PAPIER AVEC ENCAVURES

Cette production dépasse les productions moyennes obtenues par Chavarie *et al.* (1993) et Jolicoeur *et al.* (1993) pour les mêmes espèces de racines et de champignons. Ils avaient obtenu des productions de spores pour le bioréacteur brouillard de $88 \cdot g_{humide}^{-1}$ de racine inoculée $\cdot j^{-1}$ pour 68 jours de culture et de $37 \cdot g_{humide}^{-1}$ de racine inoculée $\cdot j^{-1}$ en 81 jours de culture pour celui avec gel et un grillage d'acier.

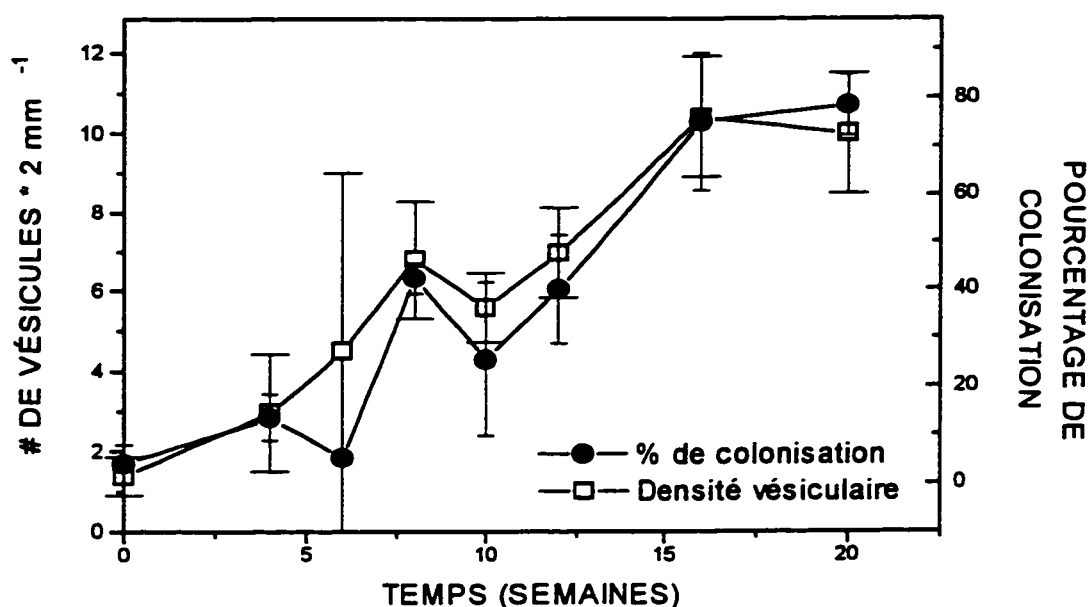


FIGURE 5.2 POURCENTAGE DE COLONISATION RACINAIRE DU BIORÉACTEUR GEL-PAPIER

La baisse de production à la 20^{ème} semaine est due à une masse de racine plus faible. En effet, la quantité de racines à l'inoculation pour les bioréacteurs de 20 semaines de culture était de 1,3 g humide plutôt que 2 g. Comme l'indice de croissance racinaire

était le même pour les bioréacteurs de 16 semaines et 20 semaines, la biomasse racinaire récoltée est plus faible, ce qui entraîne une baisse du nombre de vésicules produites. Cependant la production de vésicules par gramme de racine inoculée demeure la même.

Il est aussi important de mentionner que la production de propagules est à 84% constituée de vésicules intraracinaires. Mais leur production se fait de façon plus graduelle que celle des spores qui est concentrée entre la 8^{ème} et la 12^{ème} semaine.

5.1.4 CONSOMMATION DES NUTRIMENTS ET LEUR INFLUENCE SUR LA CULTURE

La Figure 5.1 (A) montre que la production de propagules et la croissance racinaire arrête après 16 semaines. La Figure 5.1 (B) représente les nutriments les plus consommés qui pourraient limiter la croissance racinaire et la production de propagules. Les concentrations résiduelles nulles en NO_3 et en PO_4 après 16 semaines coïncident avec l'arrêt de la croissance racinaire (Figure 5.1 A). La concentration de PO_4 qui chute après la huitième semaine de culture et devient inférieure à 0,04 mM après la 12^{ème} semaine pourrait également ne pas être suffisante pour une croissance racinaire maximale.

Ceci suggère qu'il n'y a pas eu d'accumulation d'azote suffisante par les racines pour leur permettre de croître sans azote extracellulaire. Le sucrose est également disparu du milieu, mais il reste encore du glucose et du fructose. Ce nutriment n'est donc pas déterminant dans l'arrêt de croissance et de la production d'endomycorhizes.

Il est très intéressant de comparer les courbes de production de propagules (Figure 5.1 A) et celles de consommation des nutriments (Figure 5.1 B). Le NO_3 est consommé de façon constante après la 4^{ème} semaine. L'hydrolyse du sucrose sous forme de glucose et de fructose est importante (Figure 5.1 C), mais les concentrations de NO_3 et de sucrose avant la 16^{ème} semaine sont encore assez importantes. Cependant, la concentration de PO_4 descend de façon dramatique après la huitième semaine de culture, la concentration passe même sous les 0,04 mM après la dixième semaine de culture. Cette baisse correspond au début de la phase de production massive de spores et de vésicules. Il semble donc qu'une concentration faible de PO_4 dans le milieu de culture peut favoriser le développement du champignon. Cette conclusion supporte les résultats obtenus par Ross (1971), Mosse (1973), Johnson (1976), Sparling et Tinker (1978), Stribley, Tinker et Snellgrove (1980), Plenchette, Furlan et Fortin (1983), Siqueria, Hubbell et Valle (1984), Thompson, Robson et Abbott (1986) et Amijee, Tinker et Stribley (1989).

5.1.5 SUIVI DU CPR, DU $Q_{CO_2/x}$

Le suivi de la consommation des gaz présents dans la tête du bioréacteur peut également donner des résultats intéressants. La mesure de la concentration de CO_2 présent dans la phase gazeuse des bioréacteurs montre des changements importants (Figure 5.1 D). Les barres d'erreurs représentent l'écart type entre les mesures hebdomadaires de CO_2 faites sur tous les bioréacteurs gel-papier pour cette période de culture. Cette lecture ne présente pas la production complète de CO_2 par la biomasse puisqu'il y a des pertes par les filtres du bioréacteur.

Le taux de production de CO_2 (CPR), où une correction a été faite afin de tenir compte des pertes par les filtres, suit la courbe de croissance racinaire pour les 6 premières semaines de culture (Figure 5.1 D et Figure 5.1 A). De la 6^{ème} à la 8^{ème} semaine le CPR continue d'augmenter malgré un arrêt de la croissance de la biomasse racinaire. Le CPR plafonne ensuite même si une augmentation de la biomasse racinaire importante est mesurée (l'indice de croissance passe de 3,5 à 5,5 de la 12^{ème} à la 16^{ème} semaine).

Si la figure de production de propagules et de croissance racinaire (Figure 5.1 A), est comparée à celles de consommation des nutriments (Figure 5.1 B et C) et de production de CO_2 (Figure 5.1 D) il est possible de remarquer que le plafonnement du

CPR à la 8^{ème} semaine correspond à l'augmentation radical de la consommation de PO_4 et au début de la production massive des spores et des vésicules.

Un plafonnement du CPR indique qu'il y a arrêt de division cellulaire végétale (Pépin *et al.*, 1995). Il semble donc que l'accroissement de la biomasse observé (Figure 5.1 A) après la 12^{ème} semaine soit surestimé. Pour évaluer si la production de vésicules pouvait avoir une influence sur le poids sec de la biomasse une expérience a été effectuée afin de déterminer le poids sec d'une spore (section 4.5.3). Le poids d'une vésicule peut être estimé à partir de celui d'une spore, puisqu'elles ont le même contenu. Cependant les vésicules ont un volume d'environ 2 fois celui des spores. Le poids des spores a donc été multiplié par deux afin de tenir compte de cette différence. La masse d'une spore est de 0,312 μg (4.5.3). La masse estimée d'une vésicule sèche de *Glomus intraradices* avec les hyphes qui y sont attachées est donc de 0,624 μg . En multipliant ce poids par le nombre de vésicules produites entre la 12^{ème} et la 16^{ème} semaine il est possible de remarquer que l'augmentation de la croissance racinaire est à 65% due à la production des vésicules. Il y a une erreur attachée à l'estimation du poids vésiculaire, mais cette masse importante reliée aux vésicules indique que la croissance racinaire a été beaucoup plus faible sinon nulle durant cette période.

Pour la production dans le bioréacteur avec gel et papier le taux spécifique de production de CO_2 par gramme de matière sèche de biomasse ($Q_{\text{CO}_2/x}$) semble montrer

une modification du système après la 12^{ème} semaine (Figure 5.1 E). La production de dioxyde de carbone par rapport à la biomasse présente dans la culture semble diminuer. Cette baisse est due à l'arrêt de la production malgré l'augmentation du poids de la biomasse. Cette baisse du Q_{CO2x} indiquerait donc à quel moment les vésicules sont en quantité suffisante pour influencer le poids de la biomasse.

Il faut cependant connaître la quantité de biomasse présente dans le système pour que le calcul soit valable. Cette dernière donnée est toutefois difficile à obtenir pendant les cultures.

St-Arnaud *et al.* (1996) avaient également remarqué une baisse de croissance lors de la sporulation dans le Pétri à deux compartiments. Mais ils ne remarquaient pas d'augmentation du poids racinaire après la sporulation massive. Il est probable que le milieu du compartiment racinaire était devenu pauvre d'un nutriment essentiel, mais l'article ne fait pas mention des consommations des nutriments.

Le développement du réseau mycélien se ferait donc au détriment de la production racinaire. D'autres chercheurs ont remarqué ce phénomène sur des plantes entières. Amijee *et al.* (1989) et Berta *et al.* (1990), ont remarqué une croissance racinaire plus faible pour les racines mycorhizées que celles sans présence mycélienne. Il faut

cependant noter que les racines mycorhizées possédaient plus de petites racines latérales.

La mesure de CO_2 est donc un outil très intéressant pour suivre la production durant les cultures, puisqu'en plus de savoir à quel moment la production de spores et de vésicules débute, elle permet, si le poids de la biomasse est connu, de savoir quand la production de vésicules devient très importante.

5.1.6 SUIVI DES AUTRES PARAMÈTRES MESURÉS

Le pH et la conductivité du milieu de culture sont mesurés. Le pH varie considérablement d'une mesure à l'autre, cependant il est à son point le plus bas à la 16^{ème} semaine (Figure 5.1 F). Cette baisse du pH coïncide avec la disparition du NO_3 et du PO_4 qui occasionne l'arrêt de production. Il serait intéressant de suivre en continu le pH des cultures subséquentes afin de noter si des baisses importantes du pH pourraient être reliées à la disparition importante du NO_3 et du PO_4 du milieu de culture.

La conductivité, qui représente la disponibilité des ions dans le milieu de culture, descend de façon graduelle avec la disparition des nutriments (Figure 5.1 B). Il est cependant difficile de faire un lien entre la baisse de la conductivité et la production de

racines ou de champignons. La seule conclusion qu'il est possible de faire à la suite de cette analyse, c'est que la baisse de conductivité montre la diminution de la disponibilité des nutriments dans le milieu de culture. La conductivité a donc été comparée à la consommation du NO_3 et du PO_4 qui ont été les nutriments limitants de ces cultures. Malgré la similitude dans les courbes, la conductivité continue sa descente après la consommation complète du NO_3 et de PO_4 . Il est donc difficile de déterminer un seuil de conductivité critique qui pourrait indiquer la limite de croissance racinaire et de la culture.

En résumé une faible concentration en PO_4 permet d'augmenter la production du champignon. En effet lorsque la concentration de PO_4 est inférieure à 0,04 mM les spores par litre utile passe de 20 000 en 56 jours à 185 000 avec 28 jours de plus de culture et les vésicules passe de 130 000 en 56 jours à 800 000 pour 56 jours de plus de culture. Le suivi du CPR permet de déterminer le début de la phase exponentielle de production et le taux spécifique de croissance permet de déterminer à quel instant la présence des vésicules devient assez importante pour avoir une influence sur le poids de la biomasse. Finalement le bioréacteur gel-papier donne de bonnes productions de propagules, qui dépassent les productions obtenues en bioréacteur brouillard de Chavarie *et al* (1993) (la production globale est 165 fois plus grande). Cependant, la présence d'une feuille de papier comme frontière physique cause des problèmes de mise à l'échelle. Il faut donc s'assurer qu'une frontière est bien nécessaire.

5.1.7 COMPARAISON DES BIORÉACTEURS GEL-PAPIER ET GEL

La feuille de papier qui permet le confinement des racines rejoint l'idée du Pétri à deux compartiments. Mais il est important de savoir si les productions massives de spores et les taux élevés de colonisation des racines sont effectivement reliés à la présence de cette frontière.

Dix bioréacteurs identiques à ceux de la section précédente mais sans feuille de cellulose pour créer de frontière ont donc été démarrés et leur performance étudiée. Les racines dans ce système sont directement en contact avec le milieu de culture solide. Les encavures ont été conservées pour permettre une meilleure comparaison entre ces deux systèmes. Le volume utile de ces bioréacteurs est le même que pour celui du gel et papier. Le Tableau 5.2 résume les temps de culture des dix bioréacteurs. Encore une fois deux bioréacteurs étaient récoltés en même temps et les résultats présentés en sont une moyenne. Les barres d'erreurs sur la Figure 5.3 représentent chacun des deux bioréacteurs.

TABLEAU 5.2 TEMPS DE CULTURE DES BIORÉACTEURS SANS PAPIER

Semaines cumulatives des récoltes
4
6
8
16
20

Cette Figure montre la production totale de propagules, incluant les spores, les vésicules, le pourcentage de colonisation des racines et la densité de vésicules dans les sections colonisées. La production de spores débute à la sixième semaine de culture et plafonne près de $2 \cdot 10^5$ spores $\cdot L_{\text{utile}}^{-1}$ en 112 jours de culture (voir figure 5.1). Cette production est identique à la production avec une feuille de cellulose. Le pourcentage de colonisation des racines augmente graduellement, mais ne dépasse pas 35 %. Cette colonisation peu élevée implique un nombre de propagules plus faible. En effet cette production plafonne à $3,75 \cdot 10^5$ propagules $\cdot L_{\text{utile}}^{-1}$ en 112 jours de culture.

Cette production de propagules pour une même période de culture est donc 58% plus faible que la production obtenue par le procédé gel-papier (voir figure 5.1). La

colonisation faible explique cette baisse de production, car la densité vésiculaire est près de 10, soit la même que pour la culture avec une feuille de papier, et la production de racines est identique à celle obtenue avec une frontière séparatrice (8% d'écart). La présence d'une frontière séparatrice ne permet pas d'augmenter la production de spores ou la quantité de racines produites. Sa fonction première semble donc d'augmenter le degré de colonisation des racines.

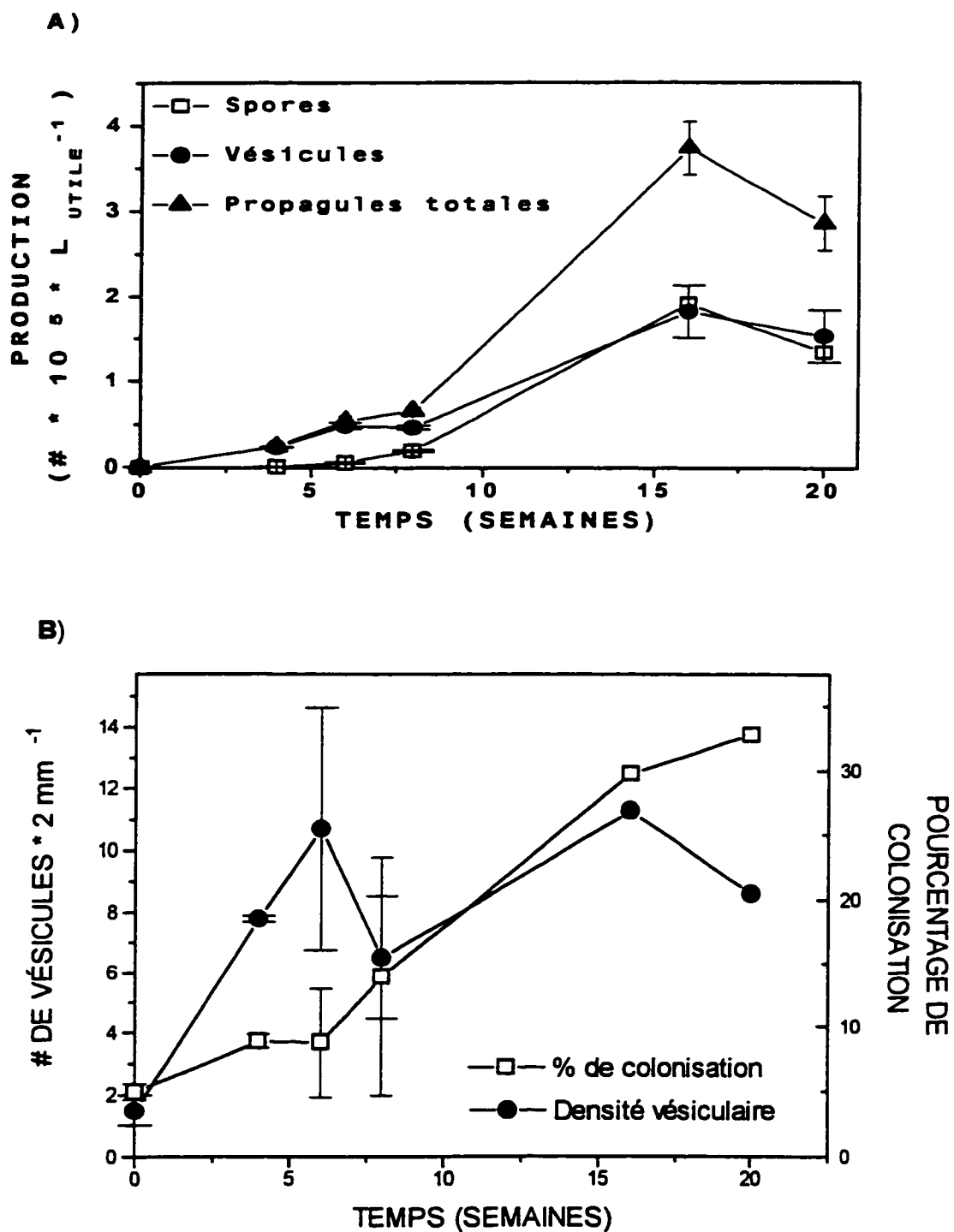


FIGURE 5.3 PRODUCTION DES BIORÉACTEUR SANS PAPIER

Ces résultats suggèrent un effet différent de l'utilisation d'une frontière, puisque cette séparation devait servir à reproduire l'effet du deuxième compartiment qui permet d'augmenter de façon significative la production de spores. Cette frontière ne joue pas ce rôle en bioréacteur, mais permet une production importante de vésicules qui résulte en une augmentation de 58% de propagules totales.

Quelques hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette augmentation de colonisation occasionnée par la présence d'une barrière physique. Pour bien les saisir il faut se référer à la section 2.2.2 où sont résumées certaines hypothèses émises afin d'expliquer l'influence de certains facteurs sur l'infectivité des racines par le champignon. Plusieurs chercheurs ont tenté d'expliquer la baisse de mycorhization par la présence d'un produit toxique qui serait largué par la plante (Morley et Mosse, 1976; Tommerup, 1984; Glenn *et al.*, 1988; El-Atrach *et al.*, 1989). Ces exsudats peuvent donc être absorbés par la feuille de papier, ce qui diminuerait leur concentration. Cependant le dégagement d'une substance toxique par certaines plantes n'est pas prouvé. Par ailleurs, Bécard et Piché (1990) ont remarqué que des exsudats provoquaient une stimulation de la croissance mycélienne plutôt qu'un ralentissement. Une des hypothèses des récents travaux de St-Arnaud *et al.* (1996) sur la production importante de spores dans le deuxième compartiment d'un Pétri à deux compartiments attribuaient cette productivité accrue à l'impossibilité de toxines larguées par les racines d'atteindre les spores dans le côté distal du Pétri. Cependant, aucune différence

de production de spores n'est observée entre les cultures des bioréacteurs gel-papier et gel seul. La feuille de papier ne semble donc pas servir à capter des exsudats toxiques pour le champignon.

Il est peu probable que la feuille de papier joue un rôle dans la reconnaissance entre les deux espèces. L'étape de pré-infection dépend plus de facteurs biologiques qui ne sont pas influencés par la présence ou non d'une frontière séparatrice comme l'indique la production de spores qui est comparable pour les deux systèmes. Cependant Carling *et al.* (1979), Warner et Mosse (1980) et Mosse *et al.* (1981) mentionnent que la proximité du champignon et la fréquence et la rapidité avec laquelle les hyphes du champignon rencontrent les racines sont des facteurs déterminants dans la qualité de l'infection qui aura lieu entre les symbiotes. Cette frontière permet aux hyphes de passer dans le milieu de culture entre les fibres de cellulose. Cependant il a été observé qu'une quantité importante du réseau mycélien demeure en surface de la feuille de papier. Les hyphes présents sur cette membrane vont forcément rencontrer plus facilement les racines et couvrir une superficie plus importante du bioréacteur. De cette façon le nombre d'appresorium (point d'entrer des hyphes) le long d'une même racine risque d'être plus important et d'augmenter le niveau de colonisation. Cette augmentation de contacts entre les deux organismes est un des facteurs qui permettrait l'augmentation de la colonisation des racines hôtes par le champignon.

La frontière séparatrice entre le milieu de culture et les racines impose également un stress hydrique et/ou nutritionnel aux racines. Puisqu'elles ne peuvent entrer en contact direct avec le milieu de culture, les racines deviennent alors limitées en nutriments disponibles et doivent faire appel au champignon afin de survivre. St-Arnaud *et al.* (1996) ont également mentionné dans l'étude des productions à l'aide d'une boîte de Pétri à deux compartiments que les nutriments du côté où se trouvent les racines étaient consommés. Les racines ont donc recours au champignon, qui se trouve dans l'autre compartiment, pour continuer leur croissance.

Ce recours au champignon par les racines peut se remarquer par un changement physiologique du champignon. Une étude récente en cours de publication par Jolicoeur *et al.* (1997) a permis d'observer une variation du pH intracellulaire des hyphes en symbiose avec des racines se trouvant isolées du milieu de culture par une feuille de papier. Ce changement observé montre que le stress imposé aux racines entraîne un changement dans la physiologie du champignon. La présence d'une frontière permet donc une meilleure colonisation des racines sans changer la performance de la culture et la production de spores.

5.1.8 DISTRIBUTION DES PROPAGULES

Avant de concevoir des systèmes de récoltes, il est bon d'évaluer la distribution des propagules à l'intérieur du bioréacteur afin de déterminer si toutes les sections du bioréacteur devront être récoltées. Il est connu que les spores se retrouvent à l'extérieur des racines dans le support de culture et que les vésicules, qui sont l'autre forme désirée des propagules, se retrouvent à l'intérieur des racines. La production de ces deux formes de propagules exige donc la récolte des racines et du milieu de culture.

La distribution des vésicules et du taux de colonisation intraracinaire a donc été évaluée sur toute la longueur des racines (section 4.5.1) afin de déterminer quelle partie des racines doivent être récoltées. Le compte visuel était fait depuis l'apex racinaire tout le long de la racine selon des sections de 2 mm. Une analyse de plusieurs racines complètes obtenues de 20 bioréacteurs différents montre que les apex des racines ne sont jamais mycorhizés. La distance moyenne depuis l'apex avant d'observer une vésicule est de 11 mm. La distance la plus fréquemment retrouvée, soit dans 35% des racines observées, est de 6 mm. Ces valeurs sont constantes, peu importe l'âge des racines, leur position et leur humidité.

Par ailleurs, le pourcentage de sections de 2 mm contenant au moins une vésicule varie selon l'âge de la culture. Évidemment, plus le pourcentage augmente, plus la distribution des vésicules sera étendue le long de la racine. De plus, pour tout âge des racines et position dans le bioréacteur, si une vésicule est retrouvée à un endroit dans la racine, les autres vésicules seront près de cet endroit. Lorsque la mycorhization s'approche de 80%, comme dans les bioréacteurs avec gel et papier, seul les apex racinaires ne contiennent pas de vésicules. Cependant quand le degré de mycorhization est plus faible il est impossible de prédire quelle partie des racines contiennent les vésicules et doivent être récoltées.

Il est également important de connaître la distribution des vésicules dans les racines se trouvant dans des endroits différents à l'intérieur des bioréacteurs afin de déterminer si elles doivent toutes être récoltées. Pour ce faire, les racines de trois parties distinctes de bioréacteurs de deux des expériences ont été séparées avant la coloration. Les Figures 5.4 et 5.5 montrent les degrés de colonisation des différentes parties, ainsi que la colonisation globale. Les deux expériences choisies sont le bioréacteur gel-papier (Figure 5.4) et avec gel seulement (Figure 5.5). Les racines observées provenaient de l'intérieur du support de culture, de la surface du support de culture ou sur la frontière séparatrice et finalement des parois du bioréacteur n'ayant aucun contact avec le milieu de culture. Ces trois zones se retrouvent dans tous les systèmes qui ont été étudiés. Les résultats obtenus peuvent donc être extrapolés d'un procédé à l'autre.

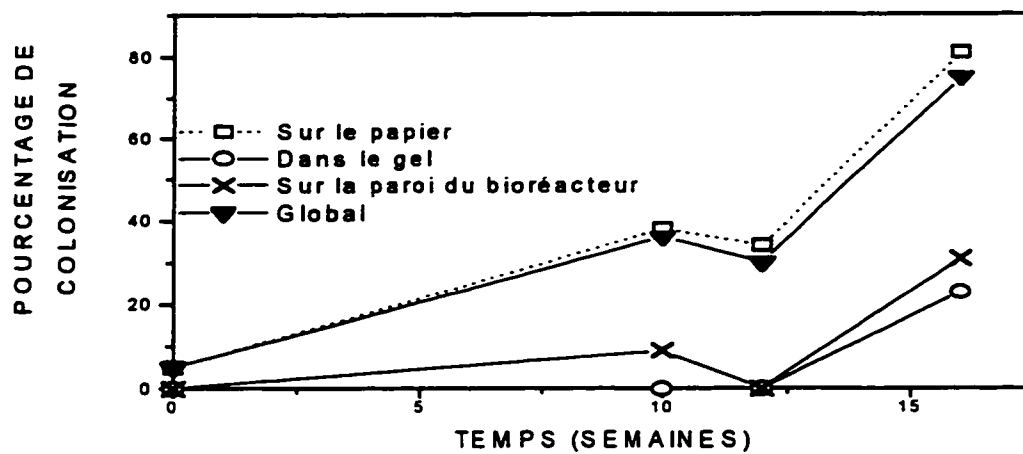


FIGURE 5.4 COLONISATION RACINAIRE SELON L'ENDROIT DANS LE BIORÉACTEUR GEL ET PAPIER

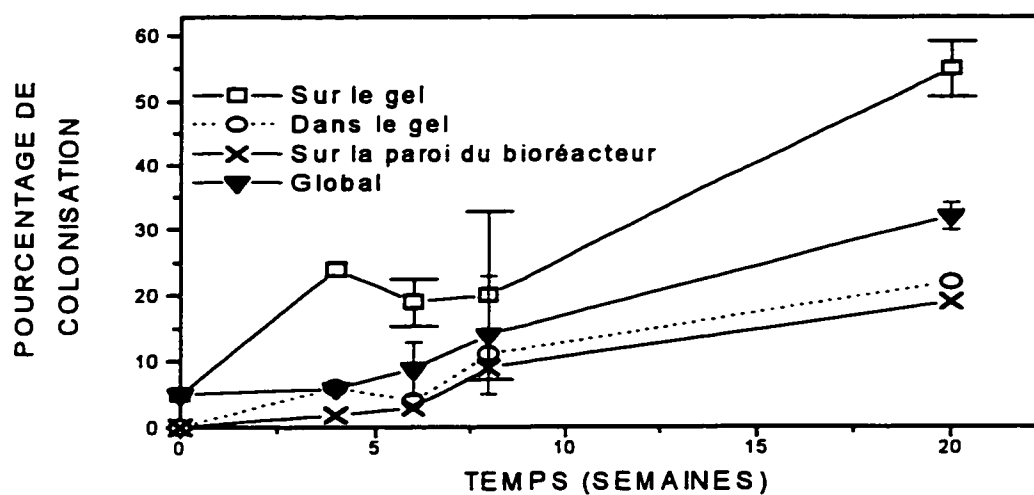


FIGURE 5.5 COLONISATION RACINAIRE SELON L'ENDROIT DANS LE BIORÉACTEUR SANS FRONTIÈRE

Les racines qui se retrouvent à l'intérieur du milieu de culture et contre les parois des bioréacteurs sont colonisées plus faiblement (20 à 30%) que les racines sur la surface du support de culture ou sur la frontière physique (55 à 80%). Cependant la masse racinaire sur les parois du bioréacteur étant beaucoup plus faible que celle sur le support (95% de moins), elle n'influence pas le pourcentage de colonisation global. Par contre, en ce qui concerne la culture sans frontière, la quantité de racines dans le milieu de culture représente en moyenne de 60% de la masse globale. Ce pourcentage élevé de racines peu mycorhizées (20% de colonisation et moins) diminue le pourcentage de colonisation global. En effet, en fin de culture après 20 semaines, le degré de colonisation des racines en surface du bioréacteur sans papier est près de 50%. Lorsque ce résultat est combiné au reste des racines du bioréacteur, qui sont en partie situées dans le milieu de culture, ce pourcentage chute à près de 30%. En résumé, les racines qui ne se retrouvent pas sur la surface du support de culture ou sur la frontière séparatrice ne valent pas la peine d'être récoltées.

5.2 ÉLABORATION DE SOLUTIONS DE REMPLACEMENT AU BIORÉACTEUR GEL ET PAPIER

5.2.1 BIORÉACTEUR TUBULAIRE

La présence d'une frontière permet d'obtenir des productions supérieures à toutes les autres configurations. Cependant, il serait intéressant d'injecter et de récolter le gel du bioréacteur plus facilement. Une configuration de bioréacteur avec des tubes a donc été utilisée pour la culture de racines mycorhizées (Figure 4.2). Cette approche nouvelle décrite à la section 4.2.3.1 est fort simple. L'idée de base est d'opérer le bioréacteur en semi-continu, c'est-à-dire de laisser les racines dans le bioréacteur pour plusieurs cultures consécutives. Il suffit de pomper du milieu gélosé frais dans les tubes afin de démarrer une nouvelle production de spores et de récolter les spores dans le gel usé et les spores produites lors du cycle précédent. La possibilité de faire plusieurs récoltes de spores avec les mêmes racines est l'aspect le plus avantageux de cette configuration.

Trois bioréacteurs tubulaires ont donc été démarrés. Chaque bioréacteur possède 5 tubes contenant 50 mL de milieu M gélosé frais pompé pour un volume total de gel de 250 mL. L'inoculum était de 2 g de racines humides par bioréacteur. Deux

bioréacteurs sont opérés en semi-continu et un en cuvée. Du milieu M frais gélifié a été pompé à l'intérieur des tubes des deux bioréacteurs opérés en semi-continu après une période de 7 à 11 semaines. Le gel expulsé des tubes lors de cette opération est ensuite analysé afin de déterminer la quantité de spores produites et la consommation des nutriments. Les trois bioréacteurs ont été récoltés après une période de culture cumulative supérieure à 20 semaines. Le Tableau 5.3 résume les temps de culture des trois bioréacteurs.

TABLEAU 5.3 TEMPS DE CULTURE DES TROIS BIORÉACTEURS TUBULAIRES

Bioréacteur	1^{ère} récolte (semaines)	Récolte finale (semaines additionnelles)	Temps cumulatifs (semaines)
1- semi-continu	7	16	23
2- semi-continu	11	16	27
3- cuvée	aucune	24	24

Les deux bioréacteurs qui ont été poursuivis après la première récolte n'ont pas subi de récolte des racines lors de la première récolte afin de ne pas endommager le réseau mycélien qui s'était développé à la surface des tubes. La production de la première

récolte n'est donc composée que de spores. Pour la récolte finale la production comprend les spores et les vésicules intraracinaires.

Le Tableau 5.4 présente les productions de spores de la première récolte des deux premiers bioréacteurs et le Tableau 5.5 présente la production finale. La production est ramenée en volume utile de bioréacteur. Ce volume de 500 mL de milieu représente le double des bioréacteurs actuels. Avec ce volume il reste 60% de vide pour les racines et pour les tubes.

TABLEAU 5.4 PRODUCTION DE SPORES DE LA PREMIÈRE RÉCOLTE DES BIORÉACTEURS TUBULAIRES

Bioréacteur	Spores de la récolte #1 ($\bullet 10^3$)
1- semi-continu	$8,4 \bullet L_{\text{utile}}^{-1}$ en 49 jours de culture
2- semi-continu	$8,0 \bullet L_{\text{utile}}^{-1}$ en 77 jours de culture
3- cuvée	Aucune récolte

TABLEAU 5.5 RÉCOLTE FINALE DES BIORÉACTEURS TUBULAIRES

Bioréacteur	Spores ($\bullet 10^5 \bullet L_{utile}^{-1}$)	Vésicules ($\bullet 10^5 \bullet L_{utile}^{-1}$)	Propagules totales ($\bullet 10^5 \bullet L_{utile}^{-1}$)
1 semi-continu	4,2 en 112 jours	1,0 en 161 jours	5,2 en 161 jours
2 semi-continu	3,8 en 112 jours	2,0 en 189 jours	5,8 en 189 jours
3- cuvée	2,0 en 168 jours	6,7 en 168 jours	8,7 en 168 jours

La première récolte (Tableau 5.4, 7 et 11 semaines) présente une faible production de spores, mais leur présence montre que le réseau mycélien avait débuté son développement. Il pourrait être avantageux d'attendre un peu plus longtemps pour effectuer la première récolte, puisque le bioréacteur qui n'a été récolté qu'une seule fois a obtenu une production de $2 \bullet 10^5$ spores $\bullet L_{utile}^{-1}$ pour 168 jours de culture (Tableau 5.5, bioréacteur 3). Il est intéressant de remarquer que cette production est semblable à la production globale de spores du bioréacteur gel-papier avec encavures ($1,9 \bullet 10^5$ spores $\bullet L_{utile}^{-1}$ pour 112 jours de culture, section 5.1.3).

Les résultats pour les deux bioréacteurs opérés en semi-continu (bioréacteur 1 et 2 au Tableau 5.5) indiquent que la quantité de spores produites dans la deuxième phase de

culture, alors que du milieu M frais a été pompé à l'intérieur des tubes et après que le réseau mycélien se soit établi, est importante. La production atteinte pour cette période est deux fois plus grande que celle obtenue avec les bioréacteurs gel-papier et encavures ($4 \cdot 10^5$ spores $\cdot L_{\text{utile}}^{-1}$ pour 112 jours de culture comparé à $2 \cdot 10^5$ spores $\cdot L_{\text{utile}}^{-1}$ pour 112 jours de culture (section 5.1.3)).

Le nombre de vésicules des racines des bioréacteurs 1 et 2, récoltés deux fois, ne représente cependant que 25% du nombre de propagules totales. Le faible taux de colonisation moyen des racines, 30% pour les 6 mois de culture avec une densité de près de 7 vésicules par 2 mm de racines, explique cette faible production. La production racinaire, peu importante, est un facteur également à considérer. Elle est effectivement 35% plus faible que celle du bioréacteur gel-papier avec encavures.

Pour le bioréacteur 3 opéré en cuvée (qui n'a été récolté qu'une seule fois), la production de vésicules est beaucoup plus importante que pour les deux autres bioréacteurs tubulaires. Le nombre de vésicules de cette culture est de $6,7 \cdot 10^5 \cdot L_{\text{utile}}^{-1}$ pour 168 jours de culture comparativement à une moyenne de $1,5 \cdot 10^5 \cdot L_{\text{utile}}^{-1}$ pour 170 jours de culture pour les deux autres cultures. Le pourcentage de colonisation de cette culture est également beaucoup plus élevé (2,6 fois). La colonisation racinaire est de 77% avec une densité de 13 vésicules par section de 2 mm de racines et un indice de croissance des racines identique aux

autres bioréacteurs tubulaires. Tout comme la production de spores, le pourcentage de colonisation de cette culture est semblable à celui obtenu avec les bioréacteurs gel-papier avec encavures (77%).

La croissance racinaire est équivalente au bioréacteur sans encavures qui est de 45% inférieure à celle avec encavures. Cette baisse de croissance indique que le contact des racines avec la surface du milieu n'est pas optimal. Les tubes devraient être beaucoup plus rapprochés les uns des autres afin que l'espace sans milieu de culture soit minimal.

Cette configuration de bioréacteur s'approche du système à deux compartiments (St-Arnaud *et al.*, 1996). Le réseau déjà développé profite du nouveau milieu de culture comme dans le deuxième compartiment du Pétri utilisé par St-Arnaud *et al.* (1996).

L'analyse du milieu de culture a permis de constater que la concentration de PO_4 a baissé sous 0,04 mM, comme dans toutes les autres cultures et que le NO_3 a été consommé, mais que sa concentration demeure supérieure à 1 mM.

En résumé, cette configuration opérée en cuvée permet d'obtenir les mêmes productions de spores et de vésicules que les bioréacteurs gel-papier avec encavures. L'apport de nouveau milieu dans le bioréacteur opéré en semi-continu semble diminuer

le pourcentage de colonisation ($< 30\%$). Cependant, cet apport de milieu frais permet une production de spores 2 fois plus grande qu'avec les bioréacteurs gel-papier avec encavures. Donc, une culture en semi-continu où seul les spores sont récoltées représente 41% de la production de propagules totales des bioréacteur gel-papier.

5.2.2 BIORÉACTEUR AVEC MILIEU LIQUIDE

Les deux configurations de bioréacteurs précédentes utilisent du gel comme support de culture. Ce type de support rend difficile la mise à l'échelle industrielle d'un procédé de production de champignons endomycorhiziens. Des cultures avec un milieu liquide non gélifié pouvant faciliter l'extrapolation à grande échelle ont donc été réalisées.

La configuration du bioréacteur est semblable à celle du système gel-papier à l'exception que le milieu est liquide et qu'évidemment il ne peut y avoir d'encavures. Une feuille de papier est déposée sur un grillage d'acier inoxydable qui est en contact avec 250 ml de milieu M enrichi en phosphate (section 4.2.2). Six bioréacteurs ont été démarrés et récoltés par paire. Les temps de récolte sont présentés au Tableau 5.6. Le volume occupé par les racines et le grillage est de 325 mL. Deux étages représentent 50% du volume total. Les productions obtenues par ces bioréacteurs ont donc été multipliées par deux. Ce type de système est basé sur une disponibilité réduite des

nutriments pour les racines. Comme il y aura évaporation d'une quantité d'eau du milieu, le papier ne sera plus en contact avec le liquide. Les racines, pour s'alimenter, devront donc utiliser les hyphes du champignon qui eux baignent dans le milieu liquide.

TABLEAU 5.6 TEMPS DE CULTURE DES BIORÉACTEURS LIQUIDES

Temps de récoltes (semaines)
6
8
12

Malgré qu'après la 8^{ème} semaine le milieu était quelques millimètres en dessous de la feuille de papier le nombre de propagules produites était très faible ($9 \cdot 10^4 \cdot L_{utile}^{-1}$ en 84 jours). Le champignon ne semble pas s'être développé, puisque seulement 10% des racines étaient colonisées.

La Figure 5.6 présente la production du champignon, le pourcentage de colonisation des racines ainsi que la densité vésiculaire de ces cultures. Ce système ne semble pas être efficace pour une production massive et rapide de propagules. Cette production ne représente que 9% de celle obtenue avec les bioréacteurs gel-papier (section 5.1.3).

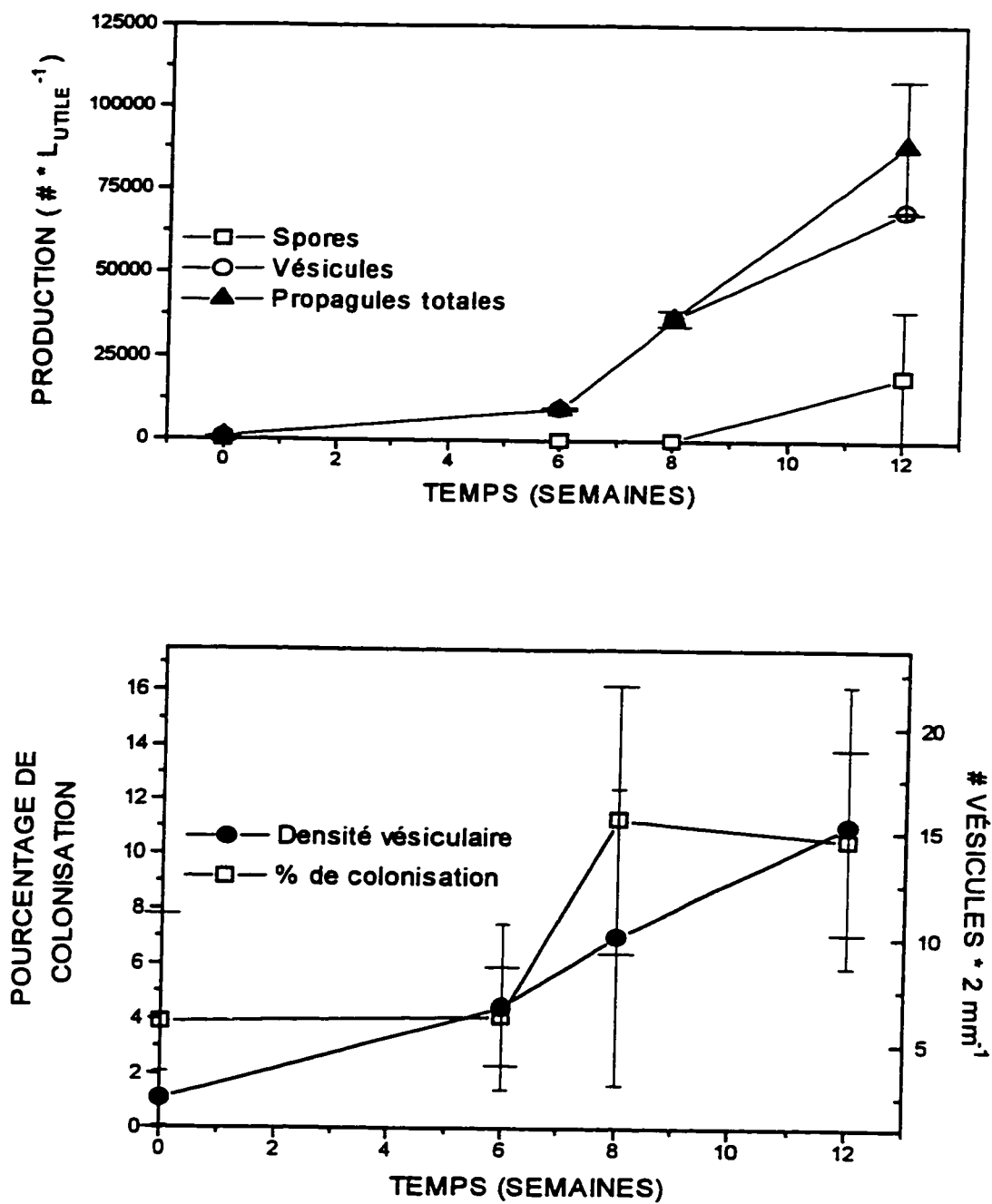


FIGURE 5.6 PRODUCTION DES BIORÉACTEURS AVEC MILIEU LIQUIDE

Cette faible production de propagules peut indiquer qu'il est préférable d'avoir une matrice solide de culture afin de supporter les hyphes du champignon. L'étude d'un système statique en milieu liquide ne fut donc pas poursuivie.

5.2.3 BIORÉACTEUR AVEC PERLITE^{MC}

Comme la présence d'une matrice solide est importante pour supporter les hyphes, un autre support de culture a été utilisé. La Perlite^{MC}, un matériel fréquemment utilisé en horticulture pour amender les sols, semble un support très intéressant. Ce matériel est stable et bien connu. Il a un pouvoir d'absorption de liquide élevé, soit de 4,5 fois son poids en eau. La Perlite^{MC} est facile à manipuler et très légère, ce qui lui permet de flotter.

Un bioréacteur basé sur le modèle avec gel et papier a donc été développé. Ce bioréacteur n'a toutefois pas d'encavures et le milieu est liquide et enrichi en PO_4 (section 4.2.2). Ce système de production semble beaucoup plus facile que les autres à transposer à l'échelle industrielle, puisque le milieu de culture est liquide que le support est facile à manipuler et qu'il sert également de frontière entre les racines et le milieu.

5.2.3.1 Plan expérimental

Huit bioréacteurs contenant 25 g de Perlite^{MC} sec, 175 mL de milieu liquide et 2 g d'inoculum ont été démarrés. Le Tableau 5.7 présente les temps de récolte de ces bioréacteurs. À chaque récolte deux bioréacteurs étaient analysés. Leur moyenne est la valeur présentée sur les figures suivantes. Les barres d'erreurs représentent les résultats bruts de ces deux bioréacteurs.

TABLEAU 5.7 TEMPS DE CULTURE DES BIORÉACTEURS PERLITE^{MC}

Temps de récoltes (semaines)
4
6
13
16

5.2.3.2 Évaluation de la production

Le volume occupé par la Perlite^{MC} et les racines est de 425 mL. Deux étages représentent donc 65% du volume total (1,3 L) du bioréacteur. La production obtenue a donc été multipliée par deux afin d'obtenir une production par volume utile.

La Figure 5.7 présente les résultats des cultures faites au moyen des bioréacteurs avec Perlite^{MC}. La figure 5.7 A montre la croissance racinaire, la production de vésicules, de spores et de propagules totales obtenues. Le nombre de spores a été évalué avec la méthode expliquée à la section 4.5.2. La production de spores débute lentement avant la 6^{ème} semaine puis il est possible d'observer une production plus importante de spores jusqu'à la 13^{ème} semaine de culture alors qu'il y a arrêt de production de spores, de vésicules et de la croissance racinaire. Comme pour le réacteur avec gel et papier, le taux de croissance des racines ralentit lors de la production de spores et de vésicules. Cependant, pour cette expérience, il n'y a pas de nouvelle hausse de production racinaire après la sporulation massive.

La production de propagules est en majeure partie composée par les spores puisque avec un indice de croissance inférieur à 3 et un pourcentage de colonisation racinaire moyen ne dépassant pas 25%, la composante vésiculaire est faible (10% des propagules totales) (Voir Figure 5.8). Cependant la production de spores est semblable à celle des bioréacteurs gel-papier ($1,85 \cdot 10^5 \cdot L_{utile}^{-1}$ pour 91 jours versus $1,85 \cdot 10^5 \cdot L_{utile}^{-1}$ pour 84 jours).

Par ailleurs comme la production de vésicules est faible la production globale des bioréacteurs Perlite^{MC} ne représente que 23% de la production des bioréacteurs gel-papier.

Il faut également remarquer que comme pour les bioréacteurs gel-papier la croissance racinaire s'arrête lors de la production massive de spores (voir Figure 5.1 A et 5.7 A)

5.2.3.3 Consommation des nutriments et leur influence sur la culture

La Figure 5.7 B et D montre l'évolution des anions et des sucres des milieux de culture que contenaient les bioréacteurs avec Perlite^{MC}. Il semble que la disparition de NO_3 et de PO_4 ait provoqué l'arrêt de la croissance racinaire et de la production du champignon.

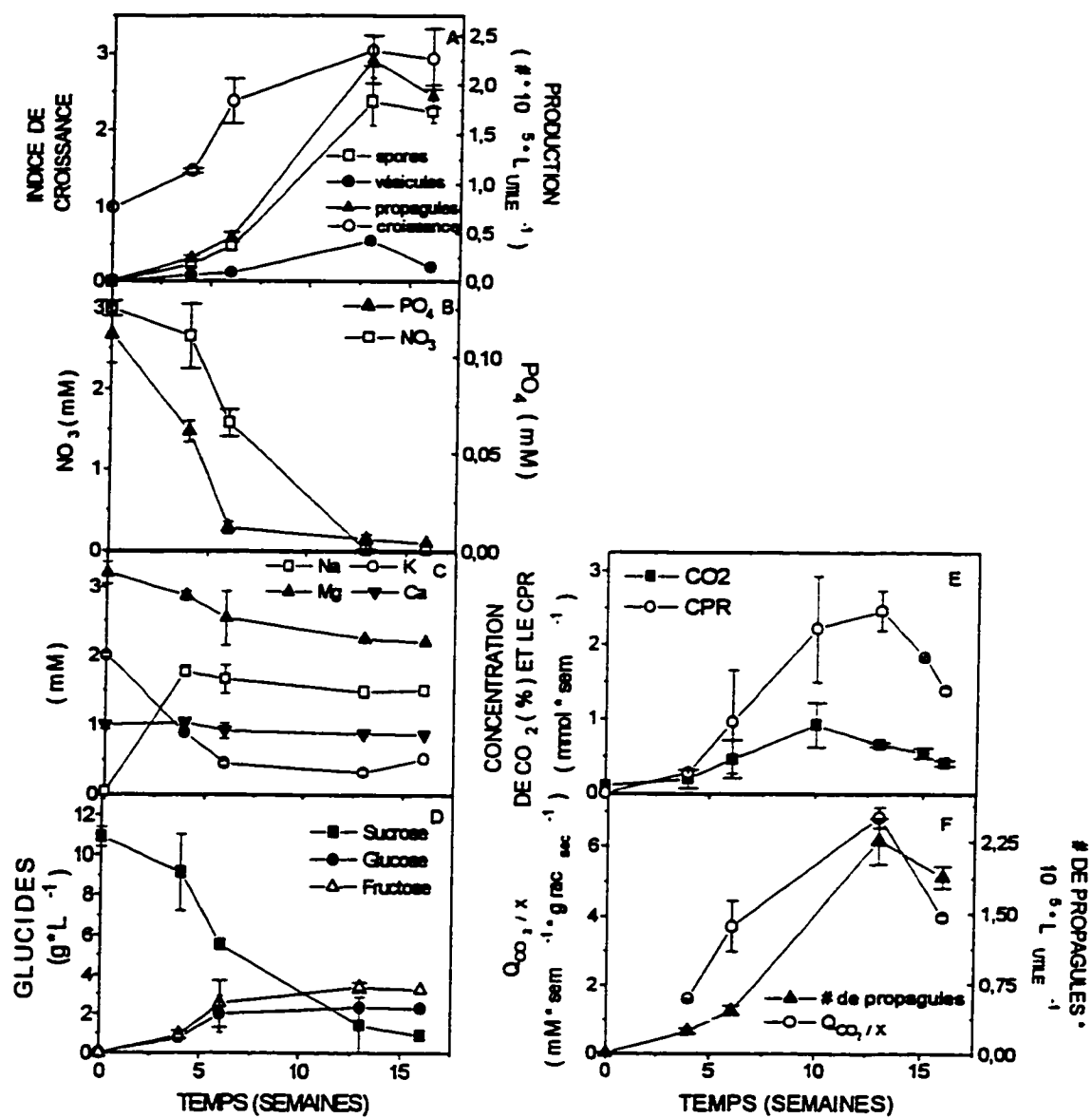


FIGURE 5.7 PRODUCTION DES BIORÉACTEURS AVEC PERLITE^{MC}

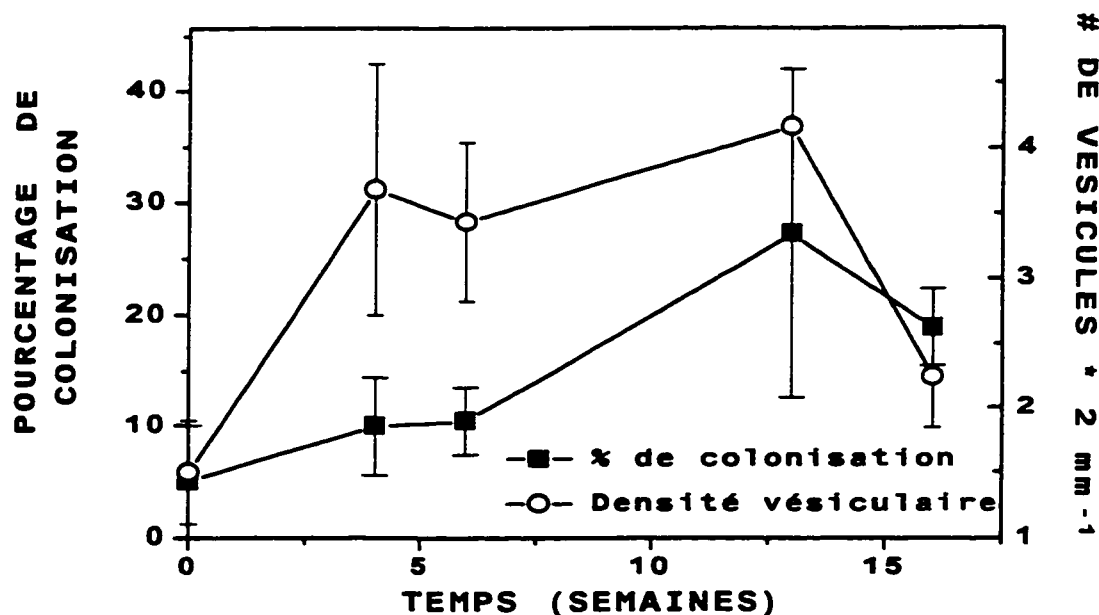


FIGURE 5.8 COLONISATION RACINAIRE DES BIORÉACTEURS AVEC PERLITE^{MC}

La production massive de spores (Figure 5.7 A), correspond à des concentrations en PO_4 inférieures à 0,04 mM. Une faible concentration de PO_4 semble encore une fois stimuler le développement du champignon comme il a déjà été observé à la section 5.1.4.

La Figure 5.7 C présente le suivi de certains cations du milieu de culture. Il est possible de voir qu'il y a un échange important d'ions sodium, provenant de la Perlite^{MC}, avec le potassium du milieu. Cet échange ionique est de 1 : 1 entre le

sodium et le potassium. La Perlite^{MC} semble donc posséder une affinité plus grande pour le potassium que pour le sodium.

Bécard et Fortin (1988) ont remarqué une baisse de colonisation racinaire de près de 40% avec une présence de 0,2 mM de Na dans le milieu de culture. Il est fort probable que la présence de 2 mM de Na dans les cultures de cette expérience ait pu diminuer la colonisation des racines sans toutefois affecter la production de spores. Comme il est présenté à la Figure 5.7 A, la production vésiculaire pour les bioréacteurs avec Perlite^{MC} est beaucoup plus faible que celle des bioréacteurs gel-papier ($43\,000 \text{ vés} \cdot L_{\text{utile}}^{-1} \cdot 112 \text{ j}^{-1}$ versus $800\,000 \text{ vés} \cdot L_{\text{utile}}^{-1} \cdot 112 \text{ j}^{-1}$). Il est fort possible que ce faible taux de production de vésicules soit relié à la présence d'une concentration importante de sodium.

Dans ces cultures, la concentration de K diminue, sans disparaître du milieu de culture ($> 0,5 \text{ mM}$). Cette baisse de K n'a probablement pas d'effet sur le taux de colonisation et sur la croissance racinaire.

5.2.3.4 Suivi du CPR et de $Q_{CO_2/x}$

L'évolution du CPR et de la concentration de CO_2 dans la phase gazeuse des bioréacteurs se retrouve à la Figure 5.7 E. Le CPR plafonne entre la 10^{ème} et 13^{ème} semaine. Cette atténuation de l'augmentation du CPR correspond à la production massive des propagules. Ce phénomène reproduit ce qui avait été observé avec les bioréacteurs gel-papier (Figure 5.1 E). La concentration de CO_2 maximale dans les bioréacteurs Perlite^{MC} est légèrement plus faible que pour les bioréacteurs gel-papier (0,927% versus 1,26%). Il faut cependant remarquer que l'indice de croissance des racines sèches des bioréacteurs gel-papier était supérieur (3,5 vs 3). Cette baisse de croissance pourrait expliquer en partie que la concentration maximale de CO_2 et que le CPR soit plus faible (2,8 mmol de $CO_2 \cdot \text{sem}^{-1}$ vs 3,5 mmol de $CO_2 \cdot \text{sem}^{-1}$).

Le taux spécifique de production de CO_2 ($Q_{CO_2/x}$), qui est présenté à la Figure 5.7 F, est difficile à interpréter, puisqu'il n'y a pas assez de données. Cependant le taux spécifique de production de CO_2 moyen est plus faible que celui des bioréacteur gel-papier (4 mmol de $CO_2 \cdot \text{sem}^{-1} \cdot \text{g rac}_{\text{sec}}^{-1}$ vs 5,5 mmol de $CO_2 \cdot \text{sem}^{-1} \cdot \text{g rac}_{\text{sec}}^{-1}$). Il n'est pas possible avec ces données de $Q_{CO_2/x}$ de faire de lien avec la production du champignon.

5.2.3.5 Saturation de la Perlite^{MC}

Comme il a été vu à la section 5.2.3.2 l'affinité plus élevée de la Perlite^{MC} pour le potassium que pour le sodium semble causer des problèmes de production. Ce support a donc été mis dans un milieu riche en potassium afin de le saturer en potassium et pour le laver de son sodium. La concentration de KNO₃ utilisée était de 5 mM, cette concentration étant beaucoup plus élevée que celle du milieu M (2 mM). La Figure 5.9 montre qu'il est possible de saturer la Perlite^{MC} avant de débiter les cultures et que cette étape peut se faire en moins d'une semaine avec des concentrations en potassium assez élevées.

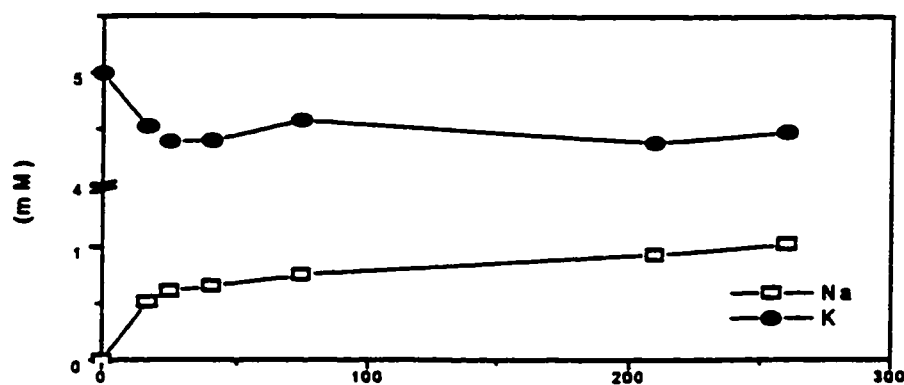


FIGURE 5.9 SATURATION DE LA PERLITE^{MC}

5.3 COMPARAISON DES PERFORMANCES DES BIORÉACTEURS

Toutes les cultures réalisées pour cette étude ont permis de mieux comprendre la production de propagules de champignons endomycorhiziens en bioréacteurs. Pour faire des choix de systèmes de production, il est primordial de comparer les performances des bioréacteurs étudiés.

5.3.1 CONFIGURATIONS NON-SATISFAISANTES

Certaines configurations sont clairement à exclure pour un procédé de production de champignons endomycorhiziens. Ainsi, toute configuration sans barrière entre les racines et le milieu de culture ne permet pas au champignon d'établir une symbiose satisfaisante avec les racines. Le bioréacteur sans feuille de papier ne permet qu'une colonisation racinaire de 35% comparativement à 80% pour le bioréacteur gel-papier. Cette baisse est significative pour la production de propagules totales (58% moins de propagules qu'avec gel et papier). Pour toutes ces raisons ce type de système est rejeté.

Le système de production avec une frontière en surface d'un milieu liquide donne des résultats de production faibles. Le nombre de propagules totales obtenues avec cette

configuration ne dépassait pas 90 000 en 84 jours, soit une production 11 fois inférieure à la production du réacteur avec gel-papier. Cette configuration ne semble donc pas intéressante.

5.3.2 COMPARAISON DES PRODUCTIONS DES BIORÉACTEURS TUBULAIRE, PERLITE^{MC} ET GEL-PAPIER

Les prototypes les plus intéressants sont donc le système gel-papier, le bioréacteur tubulaire avec milieu solide pompé et le procédé avec Perlite^{MC} comme support de culture. Le Tableau 5.8 compare les productions globales et le Tableau 5.9 présente les productions moyennes par jour de ces trois systèmes de production.

TABLEAU 5.8 COMPARAISON DE PRODUCTION DE PROPAGULES DES BIORÉACTEURS GEL-PAPIER, TUBULAIRE ET AVEC PERLITE^{MC}

Bioréacteur	Gel-papier	Tubulaire ^(a)	Tubulaire ^(b)	Perlite ^{MC (c)}
Temps de culture (semaines)	16	20	20	16
# de spores • L _{utile} ⁻¹	185 000	400 500	200 000	185 000
masse de racine récoltée (g _{rac} • L _{utile} ⁻¹)	2,0	1,0	1,3	0,7
% de colonisation	77,0	30,0	77,0	28,0
Densité vésiculaire (# • 2mm ⁻¹)	10,0	8,0	13	4,2
# de vésicules • L _{utile} ⁻¹	800 000	150 000	670 000	43 000
Propagules totales • L _{utile} ⁻¹	985 000	550 500	870 000	228 000
Propagules totales • g rac inoc ⁻¹	246 250	137 625	217 500	57 000
a: 2 ^{ème} récolte des bioréacteurs tubulaire; b: une seule récolte; c: Perlite ^{MC} non saturé au KNO ₃				

TABLEAU 5.9 PRODUCTION MOYENNE PAR JOUR DES BIOREACTEURS GEL-PAPIER, TUBULAIRE ET AVEC PERLITE^{MC}

Bioréacteur	Gel-papier	Tubulaire ^(a)	Tubulaire ^(b)	Perlite ^{MC (c)}
Temps de culture (semaines)	16	20	20	16
# de spores • L_{wet} ⁻¹ • j ⁻¹	1652	2861	1429	1652
# de vésicules • L_{wet} ⁻¹ • j ⁻¹	7143	1071	4786	384
Propagules totales • L_{wet} ⁻¹ • j ⁻¹	8795	3932	6214	2036
Propagules totales • g rac inoc ⁻¹ • j ⁻¹	2199	983	1554	509
a: 2 ^{ème} récolte des bioréacteurs tubulaire; b: une seule récolte; c: Perlite ^{MC} non saturé au KNO ₃				

Ces résultats montrent que ces systèmes statiques permettent des productions de propagules supérieures aux productions obtenues par Chavarie et al (1993). Ils avaient obtenu des productions de spores pour le bioréacteur brouillard de $88 \cdot g^{-1}$ de racines inoculées humides • j⁻¹ pour 10 semaines de culture. Il faut cependant remarquer que les productions sont exponentielles et que les comparaisons entre les performances des bioréacteurs qui n'ont pas eu des temps de cultures identiques doivent être modérées. La production des bioréacteurs gel-papier après 10 semaines était plutôt de $441 \text{ propagules} \cdot g_{\text{humide}}^{-1}$ de racine inoculée • j⁻¹ composé de 280 vésicules et de 161 spores. Il demeure que cette production est supérieure à la production obtenue par Chavarie *et al.* (1993).

La meilleure production est atteinte avec le bioréacteur gel-papier. Le bioréacteur tubulaire opéré en cuvée obtient des performances similaires, cependant la récolte des racines de ce système rend difficile sa mise en oeuvre. Le point le plus intéressant avec ce système tubulaire est la grande quantité de spores présentes dans le gel lors de la deuxième récolte de son opération en semi-continu. Cette production de spores représente 41% de la production totale de propagules du système gel et papier.

Le bioréacteur tubulaire est une avenue intéressante pour une production de spores. Ce système de production pourrait être intéressant pour une prolifération d'espèces qui ne produisent pas de vésicules infectives, comme *Gigaspora margarita* et *Gigaspora gigantea*. Ce système ne contient pas de feuille de papier qui pose de graves problèmes d'opération. Il faudrait cependant modifier le circuit de pompage du gel à grande échelle pour minimiser les pertes de liquide lors de l'insertion du gel dans les tubes. Un système à piston semble attrayant.

Le bioréacteur avec Perlite^{MC} comme support de culture permet des productions supérieures à celles observées par Chavarie *et al.* (1993) et Jolicoeur *et al.* (1993) malgré la grande quantité de sodium larguée dans le milieu de culture. Avec la saturation de la Perlite^{MC} avant le début de la culture, les pourcentages de colonisation des racines seront sûrement supérieurs à ceux obtenus (28%). Des travaux sont présentement en cours afin de vérifier cette hypothèse.

La baisse de productivité globale des bioréacteurs avec Perlite^{MC} est due à une production de vésicules faible causée par une colonisation racinaire inférieure à 30%. En ce qui concerne la production de spores des systèmes avec Perlite^{MC}, elle est identique au bioréacteur gel-papier. La production de spores n'est donc pas reliée à la colonisation racinaire. Afin d'atteindre des taux de production avec les bioréacteurs avec Perlite^{MC} équivalents au système gel-papier, il faudra augmenter le degré de colonisation racinaire. Pour ce faire, un contrôle du sodium devra être effectué.

Pour tous ces systèmes de production, il faut récolter les propagules du champignon. Selon le procédé choisi, il faudra procéder à des modifications importantes pour cette récolte. La prochaine section propose donc des avenues techniques pour la récolte des trois systèmes à l'étude.

5.4 RÉCOLTE DES BIORÉACTEURS

La récolte des propagules, le produit biofertilisant d'intérêt commercial, fait partie intégrante du procédé de culture en développement des endomycorhizes. Des méthodes pour récolter la biomasse sont donc abordées dans cette section. Chacune des méthodes de récolte est adaptée en fonction du type de bioréacteur étudié.

5.4.1 BIORÉACTEUR GEL-PAPIER

Les vésicules intraracinaires représentent 80% de la production de ce procédé. Il faut donc récolter les spores et les racines de ce bioréacteur. Il a été démontré à la section 5.1.8 qu'il n'est pas nécessaire de faire de séparation des racines pour ce procédé. Il est cependant important de couper les racines pour augmenter le nombre de propagules produites disponibles. Une étude faite par Sylvia et Jarstfer (1992) sur *Glomus* montre que la coupe des racines augmente le nombre de propagules infectives. Le découpage des racines a été réalisé dans un mélangeur culinaire et la taille de coupe optimale observée est de 63 μm . Une coupe radicale des racines semble donc à envisager.

Les spores sont en grandes parties localisées à l'intérieur du gel. Il faut donc liquéfier cette matrice pour récolter les spores. Doner et Bécard (1991) ont développé une méthode pour briser les liens du gel et le rendre liquide. Cette méthode, qui utilise un tampon citrate pour changer la configuration des liens ioniques du gel, est très simple. Pour que la dissolution soit complète et rapide ils conseillent de passer le gel dans un mélangeur culinaire après avoir ajouté une quantité de tampon citrate. Le liquide obtenu peut être facilement récupéré. Les spores et les hyphes se joignent et forment une masse de quelques millimètres. Il suffit ensuite de laver la biomasse et de la faire sécher.

Des récoltes de spores ont été réalisées, avec cette méthode, pour les bioréacteurs avec gel-papier afin de faire des essais de germination. Les taux de germination des spores dépassent les 90%, ce qui indique que cette technique permet une récupération efficace des spores sans modifier leur viabilité. Ce pourcentage élevé implique également que ce procédé produit des spores de haute viabilité.

L'usage du tampon citrate n'est pas obligatoire, puisqu'après la coupe des racines, du gel et du papier il suffit de laisser sécher pour que le gel en perdant son eau forme une couche protectrice à la surface des spores. Ces petites pellicules de gel séché sont très friables. Il serait alors facile de mélanger le tout afin d'obtenir un produit fini de qualité.

5.4.2 BIORÉACTEUR TUBULAIRE

Ce procédé opéré en semi-continu ne produit que des spores. Les racines déjà colonisées sont laissées à l'intérieur du bioréacteur à la surface des tubes et du milieu frais est pompé à l'intérieur. Cette récolte est plus simple que celle du bioréacteur avec gel et papier. Le gel déjà sous forme de pâte est recueilli pour ensuite être séchée ou mélangée avec un tampon citrate pour en extraire les spores.

5.4.3 BIORÉACTEUR AVEC PERLITE^{MC}

Pour ce procédé, les racines sont mêlées avec la Perlite^{MC}. Il faut donc couper les racines en petites sections et réduire la dimension des grains de Perlite^{MC} (section 4.5.2). Ce mélange peut ensuite être séché et entreposé. Les cultures avec Perlite^{MC} pourraient cependant être faites avec des grains de plus petites tailles. La récolte en serait simplifiée, puisque seules les racines devraient être coupées.

Si une séparation des grains de Perlite^{MC} et des racines est désirée elle sera facilitée par la taille déjà réduite des grains.

6.0 CONCLUSION

Les endomycorhizes sont appelées en principe à un brillant avenir comme engrais biologique. En effet, l'association de ce champignon à une plante lui permet d'obtenir plus facilement les nutriments essentiels pour une croissance optimale. Il lui procure également une meilleure résistance à la sécheresse, aux herbicides et aux insecticides. C'est pour ces raisons que des recherches sont réalisées afin de développer un système de production à grande échelle de champignons endomycorhiziens.

L'objectif principal de ce projet de recherche était d'étudier et de mieux comprendre les performances du bioréacteur gel-papier comme frontière physique, conçu par BIOPRO afin d'en maximiser la production pour ensuite développer un système de production industriel de champignons endomycorhiziens à arbuscules et vésicules.

Les travaux effectués sur ce procédé ont permis de montrer que la production de spores débutait sa phase exponentielle quand la concentration extracellulaire de PO_4 était inférieure à 0,04 mM. Cependant cette concentration doit être près de 0,12 mM en début de culture sinon cet ion deviendra limitant trop rapidement. Une autre possibilité serait de contrôler la concentration en PO_4 afin de ne jamais en manquer tout en la maintenant sous les 0,04 mM. Les résultats de ces cultures ont également permis

d'observer que la concentration initiale de NO_3 du milieu M (3 mM) n'était pas suffisante.

Un arrêt de la croissance racinaire a également été observé durant la production massive de propagules (entre la 8^{ème} et la 12^{ème} semaine). Il a été observé que le CPR plafonne à la 10^{ème} semaine. Ce plateau indique que la division cellulaire végétale est presque nulle et que les racines ont arrêté leur croissance. Il semblait qu'il y avait eu une reprise de la croissance racinaire après la 12^{ème} semaine, mais en réalité ce sont les vésicules qui représentent la majeure partie de cette augmentation du poids de la biomasse. Le plafonnement du CPR indique donc le début de la phase exponentielle de production des propagules. Une autre information que donne la mesure du CO_2 est le taux spécifique de production de CO_2 (Q_{CO_2X}). La baisse dans ce taux spécifique indique que le poids de la biomasse augmente sans qu'il y ait d'augmentation de la production de CO_2 . La baisse observée dans les cultures des bioréacteurs gel-papier après la 12^{ème} semaine indique que les vésicules sont en quantités suffisantes pour avoir une influence sur le poids global de la biomasse.

Le CPR et le taux spécifique ouvrent la voie au contrôle des cultures de production de champignons endomycorhiziens. Il sera maintenant possible de déterminer à quel moment la production de propagules débutera et à quel moment elle sera abondante.

Les résultats de production obtenus avec le bioréacteur gel-papier dépassent les productions déjà obtenues par BIOPRO (2198 propagules \bullet g⁻¹ \bullet j⁻¹ en 112 vs 88 propagules \bullet g⁻¹ de racines inoculées \bullet j⁻¹ en 68 jours avec des cultures au moyen d'un bioréacteur brouillard). Il faut cependant noter que seul les spores avaient été évaluées dans la production en brouillard. Cependant les résultats de production en bioréacteur gel-papier ont montré que les vésicules représentent 84% de la production finale de propagules. Malgré ces excellents résultats de production du bioréacteur gel-papier la feuille de papier utilisée comme frontière demeure un problème de production important. C'est pourquoi une série de bioréacteur sans papier ont été démarrés afin de déterminer le rôle de cette barrière physique. Les résultats de production ont montré que la frontière que crée la feuille de papier entre les racines et le milieu de culture permet d'augmenter la production de vésicules ($2 \bullet 10^5$ propagules \bullet g⁻¹ en 112 jours versus $4,4 \bullet 10^4$ propagules \bullet g⁻¹ en 112 jours).

Comme le bioréacteur gel-papier n'est pas un procédé qui peut être transposé à grande échelle, il fallait développer un système de production aussi efficace et plus facilement opérationnel. Ce bioréacteur devra avoir une frontière entre les racines et le milieu de culture afin d'augmenter la production.

Le bioréacteur tubulaire basé sur l'étude de Jolicoeur *et al.* (1993) a donc été conçu. Le gel y est pompé à l'intérieur des tubes. Les racines sont ensuite déposées sur la

surface extérieure des tubes fait d'un fin grillage en acier inoxydable (maillages 0.16 mm) afin de créer une barrière physique entre les racines et le milieu nutritif. Ce maillage ne permet alors qu'à une très faible quantité de racines de le traverser. Ce procédé est opéré en semi-continu ou en cuvée. Ce bioréacteur opéré en semi-continu permet de récolter le gel contenant des spores et d'alimenter du gel frais dans les tubes afin de débiter une nouvelle culture avec les racines déjà présentes à l'intérieures.

En opérant ce procédé en semi-continu, il a été démontré que les taux de production de spores sont considérablement améliorés. En fait, la production passe de 200 000 à 400 000 spores $\bullet L_{utile}^{-1}$ en 112 jours de culture. Cette production représente 41% de la production totale du bioréacteur gel-papier. Ce procédé pourrait être utilisé pour des productions de champignons endomycorhiziens qui ne produisent pas de vésicules.

Il faut également noter que les productions de ce bioréacteur sont semblables au bioréacteur gel-papier quand il est opéré en cuvée ($8,7 \bullet 10^5$ propagules $\bullet L_{utile}^{-1}$ en 140 jours de culture pour le tubulaire versus $9,85 \bullet 10^5$ propagules $\bullet L_{utile}^{-1}$ en 112 jours de culture pour gel-papier). Cependant pour atteindre ces productions il faut récolter les racines ce qui est plutôt complexe avec ce type de bioréacteur.

Des essais avec un nouveau support de culture ont été faites. La Perlite^{MC}, un matériel couramment employé en horticulture pour l'amendement des sols, a été utilisée. Ce

support permet une production de spores identique au bioréacteur gel-papier (185 000 spores \bullet L_{utile}⁻¹ en 112 jours de culture). Sa croissance racinaire est semblable au bioréacteur gel-papier avant la hausse de croissance (indice de croissance de 3 pour la Perlite^{MC} en 84 jours versus 3,5 pour gel-papier en 84 jours). Cependant le taux de colonisation des racines est faible (25%). La présence importante de Na qui est largué par la Perlite^{MC} semble la cause de cette production modérée de vésicules. Il est possible de saturer la Perlite^{MC} avant le début des cultures afin d'empêcher ce largage de sodium. Des cultures sont présentement en cours à BIOPRO avec de la Perlite^{MC} saturée. Des études doivent être poursuivies pour déterminer si ce type de bioréacteur pourrait permettre d'obtenir des taux de colonisation similaires à ceux des bioréacteurs gel-papier. Le bioréacteur tubulaire reste donc pour l'instant le système transposable à l'échelle industriel ayant les meilleures performances de production.

7.0 RECOMMANDATIONS

Les résultats de production de spores des bioréacteurs avec Perlite^{MC} sont identiques à ceux obtenus avec le système gel-papier. Cependant le degré de colonisation des racines est faible (25%). Il faudrait donc poursuivre les travaux qui sont présentement en cours à BIOPRO avec de la Perlite^{MC} saturée en potassium pour s'assurer que les taux de colonisation atteints sont bien ceux attendus. Il est important de faire ces travaux puisque ce bioréacteur est celui qui serait le plus facile à mettre à l'échelle industrielle.

En parallèle, des cultures de racines transformées et mycorhizées devraient être faites avec des milieux contenant différentes concentrations en sodium. Cette expérience permettrait de déterminer la concentration limite de sodium permise dans le milieu de culture, sans provoquer une baisse de la colonisation.

Il serait également important de revoir la méthode développée pour laver et saturer les grains de Perlite^{MC}. Le système de bioréacteur brouillard permettrait de faire circuler de l'eau déminéralisée ou une solution concentrée en potassium dans un lit de Perlite^{MC}. Cette dispersion du liquide sur les grains permettrait d'accélérer et d'optimiser le lavage et la saturation.

Il faudrait aussi débiter des cultures avec différentes tailles de grains de Perlite^{MC} pour voir s'il est possible de s'affranchir du fractionnement à la fin de la culture.

Les tests de chitine déjà développés pourraient être adaptés afin de permettre d'estimer plus facilement la quantité de spores présentes avec les grains de Perlite^{MC}. Une méthode pour estimer le nombre de spores permettrait d'accélérer les analyses, puisque présentement le test de germination utilisé afin d'évaluer la production de spores prend de deux à trois semaines.

Il faudrait également modifier le milieu de culture. La concentration initiale de NO_3 devrait être augmentée de façon prudente, puisqu'une concentration importante d'azote nuit à la mycorhization racinaire (section 2.3.1.2). Seulement trois cultures ont été réalisées avec le bioréacteur tubulaire. Il faudrait répéter ces cultures afin de confirmer les résultats obtenus.

Afin de déterminer le moment où le NO_3 et le PO_4 deviennent limitants dans le milieu il faudrait faire un suivi en continu du pH qui semble montrer une baisse lors de la disparition de ces deux éléments du milieu de culture.

Les résultats importants observés avec les CPR permettent d'entrevoir des moyens de suivre la production durant les cultures en bioréacteurs. Cependant il faudrait s'assurer que l'arrêt de croissance racinaire observé est dû à la production massive de propagules. Il faudrait donc faire des suivis de CO_2 sur des cultures de racines chevelues transformées non-mycorhizées. Ces données de CPR avec des racines non-mycorhizées vont permettre de confirmer que le plafonnement du CPR et que la baisse du taux spécifique de production de CO_2 sont directement reliés à la production exponentielle de propagules.

RÉFÉRENCES

- ABBOTT, L.K. et ROBSON, A.D. (1977). Growth stimulation of subterranean clover with vesicular arbuscular mycorrhizas. Aust. J. Agric. Res., 28, 639-649
- ABBOTT, L.K., ROBSON, A.D. et DE BOER, G. (1984). The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. New Phytol., 97, 437-446.
- ABBOTT, L.K. et ROBSON, A.D. (1991). Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. Agriculture, Ecosystems and Environment, 35, 121-350.
- AMJEE, F., TINKER, P.B. et STRIBLEY, D.P. (1989). The development of endomycorrhizal root systems. VII. A detailed study of effects of soil phosphorus on colonization. New Phytol., 111, 435-446.
- AORA, D.K., RAI, B., MUKERJI, K.G., et KNUDSEN, G.R. (1991). Handbook of Applied Mycology. Soil and Plants, 1, Marcel Dekker Inc. (editions), New York.

BÉCARD, G. et FORTIN, J.A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol., 108, 211-218.

BÉCARD, G., et PICHE, Y. (1989a). New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. New Phytologist., 112, 77-83.

BÉCARD, G., et PICHE, Y. (1989b). Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Appl. Environ. Microbiol., 55(9), 2320-2325.

BÉCARD, G., et PICHE Y. (1990). Physiological factors determining vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in host and nonhost Ri T-DNA transformed roots. Can. J. Bot., 68, 1260-1264.

BERTA, G., FUSCONI, A., TROTTA, A. et SCANNERINI, S. (1990). Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E₃ in the root system of *Allium porrum* L. New Phytol., 114, 207-215.

BEVEGE, D.L. et BOWEN, G.D. (1975). Endogone strain and host plant differences in development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. In Endomycorrhizas. F.E. Sanders, B. Mosse et P.B. Tinker (éditeurs). Academic Press, London, 77-86.

BIERMANN, B. et LINDERMAN, R.G. (1983). Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. New Phytol., 95, 97-105

BINNS, A.N. et THOMASHOW, M.F. (1988). Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. Annu. Rev. Microbiol., 42, 557-606.

BONFANTE-FASOLO, P. et GIANINAZZI-PEARSON, V. (1982). Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the Ericaceae. III. Morphology of the dissociated symbionts and modifications occurring during their reassociation in axenic culture. New Phytol., 91, 691-704.

BOWEN, G.D. et ROVIRA, A.D. (1969). In Root Growth, W.J. Whittington, ed., Plenum, New-York, 170-201.

BRUNDRETT, M.C., PICHÉ, Y. et PETERSON, R.L. (1984). A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Can. J. Bot., 62, 2128-2134.

BRUNDRETT, M., PETERSON, L., MELVILLE, L., ADDY, T., MCGONIGLE, T., SCHAFFER, G., BOUGHER, N. et MASSICOTTE, H. (1994). Practical methods in mycorrhiza research. Édité par M. Brundrett, L. Melville et L. Peterson, 51-61.

CALLOW, J.A. (1975). Plant lectins. Curr. Adv. Pl. Sci., 7, 181-193.

CARLING, D.E., BROWN, M.F. et BROWN, R.A. (1979). Colonization rates and growth responses of soybean plants infected by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Can. J. Bot., 57, 1769-1772.

CHAMBERS, C.A., SMITH, S.E., et SMITH, F.A. (1980). Effects of ammonium and nitrate ions on mycorrhizal infection, nodulation and growth of *Trifolium subterraneum*. New Phytol., 85, 47-62.

CHAVARIE, C., FORTIN, A., ARCHAMBAULT, J., CARON, M., HAMEL, C., LAMHAMEDI, M.S., WILLIAMS, R.D., JOLICOEUR, M., CHAOUKI, F., NANTAIS, L. et SANTOIRE, M.-J. (1993). Production de champignons endomycorhiziens en bioréacteur. Rapport final. Les Systèmes Biosys R-D inc., Montréal.

CHILTON, M.-D., TEPFER, D.A., PETIT, A., DAVID, C., CASSE-DELBART, F. et TEMPE, J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. Nature, 295, 432-434.

CRUSH, J.R. (1974). Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. New-Phytol., 73, 743-749.

DAFT, M.J. et OKUSANYA, B.O. (1973). Effect of *Endogone* mycorrhiza on plant growth. V. Influence of infection on the multiplication of viruses in tomato, petunia and strawberry. New Phytol., 72, 975.

DAFT, M.J. et EL-GIAHMI, A. (1974). Effect of *Endogone* mycorrhiza on plant growth. VII. Influence of infection on the growth and nodulation in french bean (*Phaseolus vulgaris*). New-Phytol., 73, 1139-1147.

DANIELS HETRICK, B.A. (1984). Ecology of V.A. mycorrhizal fungi. VA Mycorrhizae. CRC Press. Boca Raton, C.L.I. Éditions Powell and D.J. Bagyaraj, Florida, 35-55.

DANIELS, B.A. et TRAPPE, J.M. (1980). Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. Mycologia, 72, 475-471.

DAZZO, F.B. (1980). Absorption of micro-organisms to roots and other plant surfaces. In Absorbition of microorganisms to surfaces, Édition: Bitton, G., Marshall, K.C., New York, 253-316.

DONER, L.W. et BÉCARD, G. (1991). Solubilization of gellan gels by chelation of cations. Biotech. Tech., 5, 25-28.

DONER, L.W. et DOUDS, D.D. (1995). Purification of commercial gellan to monovalent cations salts results in acute modification of solution and gel-forming properties. Carbohydrate Research, 128, 1-9.

EL-ATRACH, F., VIERHEILING, H. et OCAMPO, J.A. (1989). Influence of non-host plants on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of host plants and on spore germination. Soil biol. Biochem., 21, 161-163.

EVANS, D.G. et MILLER, M.H. (1988). Vesicular-arbuscular mycorrhizas and the soil-disturbance-induces reduction of nutrient absorption in maize. New Phytol., 110, 67-74.

FAIRCHILD, G.L. et MILLER, M.H. (1988). Vesicular-arbuscular mycorrhizas and the soil-disturbance-induces reduction of nutrient absorption in maize. II. Developement of the effect. New Phytol., 110, 75-84.

FORTIN, A., ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., CHAVARIE, C. et JOLICOEUR, M. (1993) Aseptic in vitro endomycorrhizal spore mass production, Pat.pend. 10662-9 US, États-Unis.

GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. et OJIMA, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50, 151-158.

GARBAYE, J. (1991). Biological interactions in the mycorrhizosphere. Experimenta, 47, 307-375.

GEMMA, J.N. et KOSKE, R.E. (1988). Pre-infection interactions between roots and the mycoorrhizal fungus *gigaspora Gigantea*: chemotropism of germ-tubes and root growth response. Transaction of the British mycological Society, 91, 123-132.

GENDERMANN, J.W. (1965). Vesicular-arbuscular mycorrhizae formed on maize and tuliptree by *Endogone fasciculata*. Mycologia, 57, 562-575.

GIANINAZZI-PEARSON, V. (1984). Host-Fungus Specificity, Recognition and Compatibility in Mycorrhizae. Plant Gene Research, Genes Involved in Microbe-Plant Interactions, Verma D.P.S. and Hohn T.H. editors, Springer-Verlag, New-York.

GLENN, M.G., CHEW, F.S. et WILLIAMS, P.H. (1988). Influence of glucosaminolate content of *Brassica* (Cruciferae) roots on growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol., 110, 217-225.

GRAY, L.E. et GENDERMANN, J.W. (1969). Uptake of phosphorus-32 by vesicular-arbuscular mycorrhizae. Plant Soil, 30, 415-422.

HAMILL, J.D., PARR, A.J., RHODES, M.J.C., ROBINS, R.J. et WALTON, N.J. (1987). New routes to plant secondary products. Bio/Technology, 33, 132-138.

HARLEY, J.L. (1969). The biology of mycorrhiza. 2nd ed., Leonard Hill, London.

HATTINGH, M.J. et GENDERMAN, J.W. (1975). Inoculation of Brazilian sour Orange seed with an endomycorrhizal fungus. Phytopathology, 65, 1013-1016.

HAYMAN, D.S., JOHNSON, A.M. et RUSSESDIN, I. (1975). The influence of phosphate and crop species in Endogone spores and vesicular-arbuscular mycorrhizal under field conditions. Plant soil, 43, 489-495.

HAYMAN, D.S. (1983). The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. Can. J. Bot., 61, 944-963.

HILTON, M.G. et RHODES, M.J.C. (1990). Growth and hyoscyamine production of 'hairy root' cultures of *Datura stamonium* in a modified stress tank reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 132-138.

HIRREL, M.C., MEHRAVARAN, H. et GENDERMAN, J.W. (1978). Vesicular-arbuscular mycorrhizae in the Chenopodiaceae and Cruciferae: do they occur? Can. J. Bot., 56, 2813-2817.

HOKAMA, L.A., UEDA, T., WANG, G.M. et TUSÉ, D. (1990). The use of a perfusion for the enhanced growth of plant tissues. Abstracts IAPTC VII Congress, Amsterdam, 341.

IQBAL, S.H. et QURESHI, K.S. (1976). The influence of mixed sowing (cereals and crucifers) and crop rotation on the development of mycorrhiza and subsequent growth of crops under field conditions. Biologia (Lahore), 22, 287-298.

JASPER, D.A., ABBOTT, L.K. et ROBSON, A.D. (1989). Hyphae of a VA mycorrhizal fungus maintain infectivity in dry soil, except when the soils is disturbed. New Phytol., 112, 103-107.

JOHNSON, P.N. (1976). Effects of soil phosphate level and shade on plant growth and mycorrhizas. N.Z.J.Bot., 14, 333-340.

JOLICOEUR, M., WILLIAMS, D.R. et CHAOUKI, F. (1993). Production de champignons endomycorhiziens en bioréacteurs. Rapport d'activités, Période du 1^{er} mai au 7 août.

JOLICOEUR, M., GERMETTE, S., GAUDETTE, M., PERRIER, M. et BÉCARD, G. (1997). Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi: A symbiotic physiological marker. Accecté pour publication.

KENDRICK, B. (1985). Mycologue Publications. The fifth kingdom.

KHAN, A.G. (1975). The effect of vesicular arbuscular mycorrhizal associations on growth of cereals. II. Effects on wheat growth. Ann. Appl. Biol., 80, 27-36.

KHASA, P., FURLAN, V., FORTIN, J.A. (1990). Effets de différentes espèces de champignons endomycorhiziens sur la croissance de dix espèces de plantes tropicales au Zaïre. Tropicultura, 8, 159-164.

KLEINSCHMIDT, G.D. et GENDERMANN, J.W. (1972). Stunting of Citrus Seedlings in fumigated Nursery soils related to the absence of endomycorrhizae. Phytopathology, 62, 1447-1453.

MARX, D.H., BRYAN, W.C. et CAMPBELL, W.A. (1971). Effect of endomycorrhizae formed by *Endogone mosseae* on growth of citrus. Mycologia, 63, 1222-1226.

MARX, D.H., HATCH, A.B. et MENDICINO, J.F. (1976). High soil fertility decrease sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. Can. J. Bot., 5, 1569-1574.

MENGDEN, K. (1978). Attachment of bean rust cell wall material to host and non-host plant tissue. Arch. Microbiol., 119, 113-117.

MENGE, J. A. (1982). Effect of soil fumigants and fungicides on vesicular-arbuscular fungi. Phytopathol., 72, 1125-1132.

MILLER, R.M., MOORMAN, T.B. et SCHMIDT, S.K. (1983). Interspecific plant association effects on vesicular-arbuscular mycorrhiza occurrence in *Atriplex confertifolia*. New Phytol., 95, 241-246.

MITCHELL, D.T. et READ, D.J. (1981). Utilization of inorganic and organic phosphates by the mycorrhizal endophytes of *Vaccinium microcarpon* and *Rhododendron ponticum*. Transaction of the British mycological Society, 76, 255-260.

MORLEY, C.D. et MOSSE, B. (1976). Abnormal vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in white clover induced by lupin. Trans. Br. Mycol. Soc., 67, 510-513.

MORRISON, T.M. (1957). Host-endophyte relationships in mycorrhizas of *Pernettya macrostigma*. New Phytol., 56, 247-257.

MOSSE, B. (1973). Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Ann. Rev. Phytopathol., 11, 171-196.

MOSSE, B., STRIBLEY, D.P. et LETACON, F. (1981). Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. Adv. Microb. Ecol., 5, 137-210

MUGNIER, J. (1988). Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep., 7, 9-12.

MURASHIGE, T. et SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant, 15, 473-479.

MURRAY, G.M. et MAXWELL, D.P. (1975). Penetration of *Zea mays* by *Helminthosporium carbonum*. Can. J. Bot., 53, 2872-2883.

NELSON, C.D. (1964). The production and translocation of photosynthate C¹⁴ in conifers. In formation of wood in forest trees, Ed. M.H. Zimmerman, Maria Moors Cabot Foundation, New-York, 235-257.

NEMEC, S. et TUCKER, D. (1983). Effects of herbicides on endomycorrhizal fungi in Florida citrus (*Citrus spp.*) soils. Weed Sci., 31, 427-431.

OCAMPO, J.A., MARTIN, J. et HAYMAN, D.S. (1980). Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and non-host plants grown together. New Phytol., 84, 27-35.

PEARSON, V. et READ, D.J. (1973). II. The transport of carbon and phosphorus by the endophyte and the mycorrhiza. New Phytol., 72, 1325-1331.

PÉPIN, M.F., ARCHAMBAULT, J., CHAVARIE, C. et CORMIER, F. (1995). Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures : I. Shake flask cultures. Biotech. Bioeng., 47, 131-138.

PLENCHETTE, C., FURLAN, V. et FORTIN, J.A. (1983). Responses of endomycorrhizal plants grown in a calcines montmorillonite clay to different levels of soluble phosphorus. I. Effect on growth and mycorrhizal development. Can. J. Bot., 61, 1377-1383.

READ, D.J. et STRIBLEY, D.P. (1973). Effect of mycorrhizal infection on nitrogen and phosphorus nutrition of ericaceous plants. Nature, London, 244, 81-82.

RHODES, M.J.C., ROBINS, R.J., HAMILL, J.D., PARR, A.J. et WALTON, N.J. (1987). Secondary product formation using *Agrobacterium rhizogenes*-transformed "hairy root" cultures. TCA Newsl., 53, 2-15.

RICH, J.R. et BIRD, G.W. (1974). Association of early-season vesicular-arbuscular mycorrhizae with increased growth and development of cotton. Phytopathology, 64, 1421-1425.

ROSS, J.P. (1971). Effect of phosphate fertilization on yield of mycorrhizal and nonmycorrhizal soybeans. Phytopathology, 61, 1400-1403.

SAFIR, G. R. (1987). Ecophysiology of VA mycorrhizal plants. CRC Press, New York.

SCHENK, N.C. et HINSON, K. (1973). Response of nodulating and nonnodulating soybeans to a species of *Endogone* mycorrhiza. Agron. J., 65, 849-850.

SCHWAB, S.M., JOHNSON, J.A. et MENGE, J.A. (1982). Influence of simazine on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Chenopodium quinoa* Willd. Plant Soil, 64, 283-288.

SCHWAB, S.M., LEONARD, R.T. et MENGE, J.A. (1984). Quantitative and qualitative comparison of root exudates of mycorrhizal and 'nonmycorrhizal' plants. Can. J. Bot., 62, 1227-1231.

SHARP, J.M. et DORAN, P.M. (1990). Characteristics of growth and tropane alkaloid synthesis in *Atropa belladonna* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Biotechnology, 16, 171-186.

SIEVERDING, E. (1991). Vesicular-Arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. TZ-Verlagsgesellschaft mbh, Germany.

SIMON, L., BOUSQUET, J., LÉVESQUE, R.C. et LALONDE, M. (6 mai 1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular plants. Nature, 363, 67.

SIQUERIA, J.O., HUBBELL, D.H. et VALLE, R.R. (1984) Effects of phosphorus on formation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Pesquisa Agropecuaria Brasilia, 19, 1465-1474.

SPARLING, G.P. et TINKER, P.B. (1978). Mycorrhizal infection in Pennine grassland. I. Levels of infection in the field. Journal of Applied Ecology, 103, 943-950.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C. et FORTIN J.A. (1996). Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. Mycol. Res., 100, 332-338.

STRIBLEY, D.P. et READ, D.J. (1976). The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. VI. The effects of mycorrhizal infection and concentration of ammonium nitrogen on growth of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) in sand culture. New Phytol., 77, 63-72.

STRIBLEY, D.P., TINKER, P.B. et SNELLGROVE, R.C. (1980). Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the relations of plant growth, internal phosphorus concentration and soil phosphate analyses. Journal of soil Science, 31, 655-672.

SYLVIA, D.M. et JARSTFER, A.G. (1992). Sheared-root of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology, 01, 229-232.

TAYA, M., YOYAMA, A., KONDO, O. et KOBAYASHI, T. (1989). Growth characteristic of plant hairy roots and their cultures in bioreactors. Journal of Chemical Engineering of Japan, 22 (1), 84-89.

TESTER, M., SMIDT, S.E. et SMIDT, F.A. (1987). The phenomenon of "nonmycorrhizal" plants. Can.J.Bot., 65, 419-431.

THEODORU, C. et BOWEN, G.D. (1971). Effects of non-host plants on growth of mycorrhizal fungi of radiata pine. Aust. For., 35, 17-22.

THOMPSON, J.P., ROBSON, A.D. et ABBOTT, L.K. (1986). Effects of phosphorus on the formation of mycorrhizas by *Gigaspora calospora* and *Glomus fasciculatum* in relation to root carbohydrates. New Phytol., 103, 751-765.

TOMMERUP, I.C. (1984). Development of infection by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in *Brassica napus* L. and *Trifolium subterraneum* L. New Phytol., 98, 487-495.

TRAPPE, J. M., MOLINA, R. et CASTELLANO, M. (1984). Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. Ann. Rev. Phytopathol., 22, 331-359.

TRINICK, M.J. (1977). Vesicular-arbuscular infection and soil phosphorus utilization in *Lupinus spp.* New Phytol., 78, 297-304.

ULUATAM, S.S. (juin 1991). Assessing perlite as a sand substitute in filtration. American Water Works Ass. Journal, 83, 70-71.

UOZUMI, N. et KOBAYASHI, T. (1994). Application of Hairy Root and Bioreactors. Advances in Plant Biotechnology. Ryu and Furusaki editors. Elsevier. pp.307-337.

WARNER, A. et MOSSE, B. (1980). Independent spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil, Trans. Br. Mycol. Soc., 74, 407-410

WEATHERS, P.J. et CHEETHAM, R.D. (1988). Dramatic increases in shoot number and lengths for *Musa*, *Cordyline* and *Nephrolepis* using nutrient mists. Acta Horticulturae, 230, 39-44.

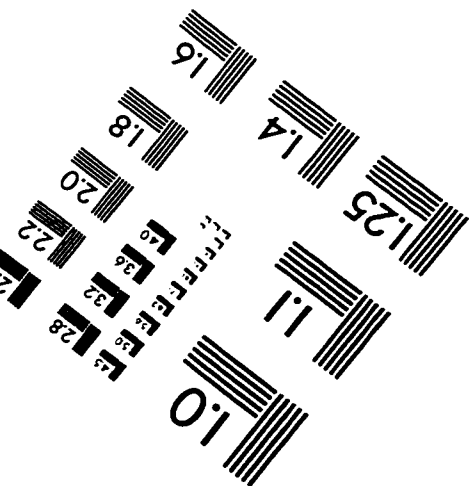
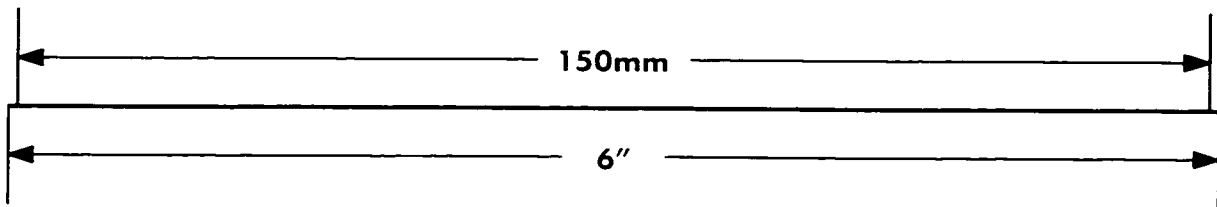
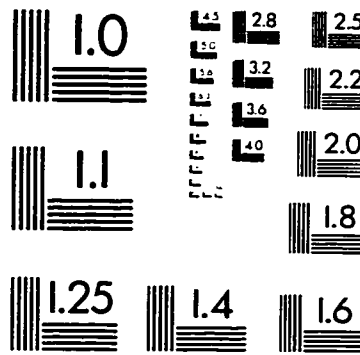
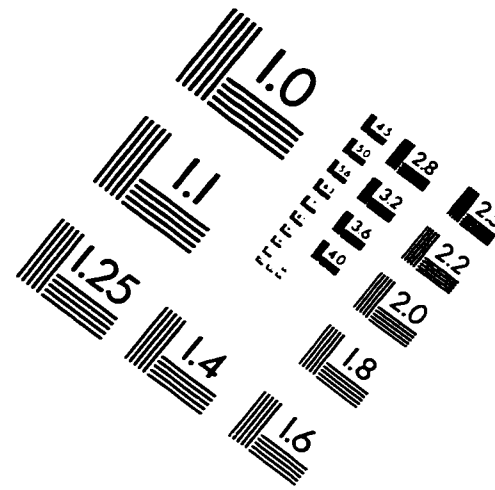
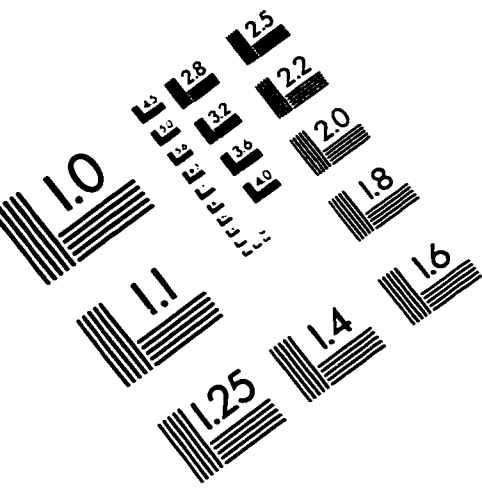
WHITNEY, P.J. (1990). Novel bioreactors for plant root organ cultures. Abstracts IAPTC Congress, Amsterdam, 342

WHITNEY, P.J. (janvier 1992). Novel bioreactors for the growth of roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Enzyme Microb. Technol., 14, 13-17.

WILLIAMS, S.E., WOLLUM, A.G. et ALDON, E.F. (1974). Growth of *Atriplex canescens* (pursh) Nutt. improved by formation of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 38, 962-965.

WILSON, P.D.G., HILTON, M.G., ROBINS, R.J. et RHODES, M.J.C. (1987).
Fermentation studies of transformed root cultures. Bioreactors and Biotransformations,
G.W. MOODY et P.B. BAKER (éditeurs), Elsevier Applied Science Publishers, New
York, 38-51.

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc
1653 East Main Street
Rochester, NY 14609 USA
Phone: 716/482-0300
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved

